Influence du métabolisme maternel sur la fonction placentaire et la santé du poulain

Morgane Robles

▶ **To cite this version:**

Morgane Robles. Influence du métabolisme maternel sur la fonction placentaire et la santé du poulain. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA029 . tel-01983066

HAL Id: tel-01983066

https://theses.hal.science/tel-01983066

Submitted on 16 Jan 2019

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 : 2017SACLA029

Influence du métabolisme maternel sur la fonction placentaire et la santé du poulain

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Jouy en Josas, le 19/10/2017, par

Morgane Robles

Composition du Jury :

Corinne Cotinot Directeur de recherche, INRA (UMR 1198 BDR)	Président
Ann Van Soom Professeur, Université de Ghent	Rapporteur
Francesco Camillo Professeur, Université de Pise	Rapporteur
Madia Charlier Chargé de recherche, INRA (UMR 1313 GABI)	Examinateur
Eric Palmer Retraité	Examinateur
Dominik Burger Vétérinaire, Université de Bern	Examinateur
Pascale Chavatte-Palmer Directeur de recherche, INRA (UMR 1198 BDR)	Directeur de thèse
Anne Couturier-Tarrade Chargé de recherche, INRA (UMR 1198 BDR)	Co-Directeur de thèse

Thèse de doctorat

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Prof. Anne Van Soom et le Prof. Francesco Camillo qui ont accepté, malgré la distance et langue, de rapporter ce travail de thèse. Je souhaite remercier également le Dr. Corinne Cotinot, le Dr. Madia Charlier, le Dr. Eric Palmer et le Dr. Dominik Burger pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci pour le temps que vous avez accordé à la lecture de cette (longue) thèse, ainsi que pour votre présence à Jouy en Josas malgré vos emplois du temps respectifs.

Un grand merci également à Laurence Wimel et Pauline Doligez ainsi que les Dr. Catherine Viguié, Eric Palmer, Sophie Calderari et Didier Serteyn pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et m'avoir conseillée et accompagnée le long de ces réunions. Vos différents angles d'approche m'ont permis de mieux comprendre mon travail dans son ensemble.

S'il fallait faire court, cette thèse se résumerait à trois années extrêmement riches en nouvelles expériences, rencontres et voyages tant sur le plan professionnel que personnel. Je ne compte plus le nombres d'heures passées sur les routes, le nombre de kilomètres parcourus, d'articles lus, d'échantillons dosés, de FSIVGTT réalisés... Ces années seront passées comme un souffle puissant et énergique, une succession de challenges et d'expériences précieuses qui me serviront toute ma vie et seront pour beaucoup à la base de la vie professionnelle que je mènerai plus tard. Vous êtes nombreux à m'avoir accompagné et à avoir participé de près ou de loin à ce projet, je vous remercie tous.

Je souhaite tout d'abord remercier mes directrices de thèse, le Dr. Pascale Chavatte-Palmer et le Dr. Anne Couturier-Tarrade pour m'avoir pris en stage, malgré ma photo de CV, pour m'avoir si bien encadrée durant ces trois années et demi, pour votre implication, pour toutes vos relectures, je n'aurai jamais pu faire tout ce que j'ai fait sans que vous vous rendiez aussi disponibles pour soutenir également le rythme de cette thèse. Votre humanité m'a permis de traverser les « coups de mou » et de rester efficace et énergique jusqu'au bout, pour cela je vous remercie. Un grand merci à Pascale pour ton soutien, pour m'avoir permis de mettre un pied dans la filière équine sur le plan professionnel et scientifique et pour m'avoir offert toutes ces opportunités.

Un grand merci à l'équipe de la station expérimentale de Chamberet, dirigée par Laurence Wimel. Sans vous cette thèse n'aurait pu exister. Vous abattez un énorme travail avec les animaux qui est à la base de tout ce qui a pu être fait ici. Un merci particulier à Cédric Dubois, pour son implication, son énergie inébranlable, pour sa bonne humeur et pour avoir fait en sorte que les manips se soient toujours très bien passées. Je n'oublierai pas les innombrables FSIVGTT réalisés, les fraises tagada, la recherche de

cathéter mystérieusement disparu, la course dans le noir après les juments à 6h du matin... Maintenant je sais tenir un poulain et beaucoup de ce que j'aurai appris à la station me sera utile. Merci également à Joseph, Cassandra, Laetitia et Sébastien pour votre aide avec les animaux. Grâce à vous tous, les journées se sont toujours passées dans la bonne humeur.

Je souhaite également remercier l'équipe du Dr. Didier Serteyn et particulièrement le Dr. Luis Mendoza pour être venu de si loin faire les radios des poulains. Merci également pour ton implication dans FoaliNet, pour ta bonne humeur quotidienne et pour m'avoir accepté comme assistante vétérinaire, le temps de réaliser les radios des poulains. Merci également à Brigitte Deliège d'être venue faire les radios du premier protocole, nous permettant ainsi de pouvoir avancer en parallèle sur les tests métaboliques. Merci enfin à toute l'équipe de la clinique de Mont-le-Soie qui était impliquée dans la relecture des clichés radiographiques et dans ce projet, de près ou de loin.

Un grand merci à Michèle Dahirel. Grâce à toi, nous avons pu doser tous les échantillons que nous voulions. Ton efficacité associée à ta bonne humeur ont permis à ces milliers d'échantillons d'être dosés en temps et en heure et toujours dans la décontraction. Je penserai longtemps à nos tours de plaques AlphaLisa, je pense que nous avons réussi à construire un très bel immeuble.

Merci également au Dr. Luc Jouneau et à François Piumi pour avoir pris en charge les analyses bioinformatiques des placentas, pour votre disponibilité et pour votre aide. Grâce à vous, nous avons pu écrire un très beau papier.

Je voudrai également remercier l'équipe du Dr. Hélène Bouraïma-Lelong et en particulier le Dr.Camille Gautier pour avoir réalisé toutes les analyses sur les testicules des poulains et pour avoir collaboré avec nous de manière aussi efficace et agréable. Votre travail nous a permis de compléter les profils phénotypiques des poulains et de mieux intégrer nos observations.

Je souhaite également remercier le Dr. Corinne Cotinot pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR BDR ainsi que tout le reste de l'équipe PEPPS. Merci pour votre aide lors des répétitions, pour votre soutien quotidien et pour votre implication dans ce travail : merci à Marie-Christine Aubrière pour son aide pour la biologie moléculaire, merci à Marie-Sylvie Lallemand pour avoir accepté d'inclure les derniers placentas, merci à Josiane pour m'avoir appris à réaliser des coupes semi-fines et pour le travail abattu avec Audrey Geeverding en microscopie électronique, merci au Dr. Delphine Rousseau-Ralliard et Tiffanie Josse pour avoir aussi efficacement dosé les acides gras dans les nombreux échantillons disponibles, merci à Christophe Richard et Eve Mourier pour être descendus plusieurs fois à Chamberet pour les échographies, enfin, merci au Dr. Sylvaine Camous pour m'avoir aidé à maîtriser et valider la technique alpha-Lisa sur les plasmas de chevaux.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'UMR BDR qui m'ont, un jour ou l'autre, aidé à avancer sur mon projet.

Je voudrai également remercier le Dr. Catherine Viguié, qui, en plus d'avoir participé à mon comité de thèse a réalisé tous les dosages des hormones thyroïdiennes sur les plasmas des poulains en croissance.

Merci également à Bénédicte Lagofun pour son efficacité impressionnante pour les dosages d'urée, des triglycérides et des acides gras non estérifiés dans les plasmas de juments.

Merci à Pauline Doligez de m'avoir accueillie à la jumenterie des Haras du Pin. Pour nous avoir permis de tester la méthode d'échographie sur le troupeau, pour nous avoir aidé à réaliser les notes d'états et pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Merci au Dr. Daniel Tomé pour avoir accepté de nous aider sur la partie acides aminés du protocole arginine, qui est encore en analyse et pas inclus dans cette thèse. Merci à Nadia Khodorova et surtout au Dr. Juliane Calvez pour nous avoir appris à doser les acides aminés dans les plasmas de juments, pour votre disponibilité et pour avoir faire en sorte que tous les dosages puissent être fait dans notre emploi du temps restreint. Ces résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit mais sont la prochaine étape de ce projet.

Merci à Pierre Julienne de nous avoir invité à présenter les travaux de cette thèse devant les éleveurs de chevaux Trotteurs Français. J'ai pu ainsi découvrir le monde du trot et confronter directement les résultats de mon travail avec les éleveurs. Ces échanges ont été extrêmement enrichissants, m'ont forcé à vulgariser mon travail et à prendre du recul.

Un très grand merci à tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires qui sont venus hanter les murs de ce laboratoire : à Pauline Peugnet pour m'avoir encadrée lors de mon M2 et pour m'avoir si bien préparée à la gestion de ce projet, pour avoir également lancé ce projet qui nous tenait tant à cœur : FoaliNet. A Sarah Valentino, pour tout ce que nous avons pu partager au laboratoire et en dehors, pour les licornes et pour nos morues respectives, je pense qu'il est inutile de chercher à compter le nombre de sushis que nous aurons consommé durant ces années. Merci à Emilie Nouveau pour ton travail acharné sur FoaliNet et pour avoir passé du temps sur les placentas des juments obèses, je viendrai voir Pupuce le retraité et Caraway lorsque je reviendrai en Bretagne. Merci à Emilie Derisoud pour avoir, avec toujours autant de bonne humeur, passé un temps non négligeable à Chamberet et pour avoir été la fourmi ouvrière du projet arginine. Merci à Audrey Geeverding pour tout le travail réalisé sur les placentas du projet arginine et pour ton soutien. Les filles, je regretterai nos soirées « pirogue-sushis-cinéma ». Merci à Audrey Lesage pour m'avoir donné autant de sérum de veau fœtal et pour

tant d'autres choses. Merci à Orlando Valenzuela et Laura Torres-Rovira pour avoir partagé un peu de votre pays d'origine avec nous. Merci à Pauline Hoarau, Jérôme Delmotte, Julie Dechartres, pour les bons moments passés en votre compagnie.

Merci à tous les membres de l'équipe FoaliNet pour avoir fait vivre le projet : Luis Mendoza, Emilie Nouveau, Pauline Peugnet, Marion Ferard, Sarah Valentino, David Heijnen, Charlotte Gibson et Alice Corbin. Si le projet est en pause à l'heure actuelle, je ne doute pas qu'il nous aura fait évoluer et progresser sur de nombreux fronts. Nous avons tous en nous désormais cette petite âme d'entrepreneur.

David, je n'ai pas les mots pour exprimer ce que ton soutien infaillible m'a permis d'accomplir. Tu étais là dans les meilleurs et les pires moments, toujours à mes côtés. Merci de m'avoir supporté tout ce temps et d'avoir aussi bien respecté l'exigence en matière de quantité et de temps de travail de cette thèse. J'espère que je pourrai un jour te rendre la pareille.

Merci à Julie, tu vois la thèse on finit toujours par en voir le bout ! Merci d'être là à tout moment de la journée malgré les nombreux kilomètres qui nous séparent. Ton amitié est précieuse et je la garde bien au chaud.

Merci à mes parents pour tout. Pour avoir toujours respecté mes choix d'étude, pour m'avoir aidé dans les moments difficiles et pour m'avoir accompagné dans ma passion. Merci à toute ma famille pour avoir participé à ma construction. Merci à mes grand-parents pour leur soutien indéfectible. Merci aux cousines, en particulier Victoria et Céline, pour m'avoir offert quelques fenêtres bienvenues sur le dos de vos bestioles. Merci à Céline et Jean-Pierre de si bien vous occuper de Mission et Heliaz et de me permettre de garder un pied dans le monde de l'élevage.

Je dédie cette thèse à Mission Divine et Héliaz el Kohiba, ma jument et mon premier poulain. Les conclusions de cette thèse ont été suivies au mieux durant la gestation de Mission, Héliaz devrait donc être un merveilleux futur cheval de sport. Merci à mon chat de rendre mes journées également plus riches en ronronnements. Une dernière pensée pour Urian au paradis des chiens… Tu auras été un compagnon inestimable et je regrette déjà ces quatorze années passées à tes côtés.

Enfin, le projet FOETALIM ainsi que ce travail de thèse ont été financés par l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation ainsi que par le Fonds Eperon. Sans ce financement très généreux, ce projet n'aurait jamais pu voir le jour. Merci également à la grande confiance que vous avez accordé à nos projets et nos idées, merci de nous avoir invité à présenter ces résultats et d'avoir valorisé nos résultats auprès de la filière.

Sommaire

Liste des publications....8

Liste des illustrations....12

Liste des abréviations....17

Partie A : Introduction....21

Introduction générale....22

1. **Alimenter les équins....26**
   - **1.1. Bases scientifiques des calculs de besoins....26**
     - **1.1.1. Niveaux d'énergie....26**
     - **1.1.2. Besoins de maintenance....27**
     - **1.1.3. Besoins de la croissance fœtale et de la gestation....27**
       - **1.1.3.1. Croissance fœtale....27**
       - **1.1.3.2. Besoins gestationnels....28**
         - *1.1.3.2.1. Système INRA*....28
         - *1.1.3.2.2. Système NRC*....29
       - **1.1.3.3. Facteurs supplémentaires non pris en compte dans le calcul des besoins....30**
         - *1.1.3.3.1. Métabolisme de la jument gestante*....30
           - 1.1.3.3.1.1. Métabolisme glucidique....30
           - 1.1.3.3.1.2. Métabolisme lipidique....30
           - 1.1.3.3.1.3. Métabolisme azoté....31
         - *1.1.3.3.2. Evolution de l'état corporel et disponibilité nutritionnelle*....32
       - **1.1.3.4. Conclusion....32**
   - **1.2. Pratiques d'élevage et connaissances des recommandations nutritionnelles internationales....32**
     - **1.2.1. Estimer l'état corporel d'un cheval....32**
       - **1.2.1.1. La note d'état corporel....33**
         - *1.2.1.1.1. Description de la méthode*....33
         - *1.2.1.1.2. Prédictibilité, reproductibilité, sensibilité de la méthode*....33
         - *1.2.1.1.3. Limites de la méthode*....34
         - *1.2.1.1.4. Conclusion*....34
       - **1.2.1.2. Les mensurations morphométriques....34**
       - **1.2.1.3. L'échographie de gras sous-cutanée....35**
         - *1.2.1.3.1. Description de la* méthode....35
         - *1.2.1.3.2. Meilleur point de mesure*....35
         - *1.2.1.3.3. Limites de la méthode*....35
         - *1.2.1.3.4. Conclusion*....36
       - **1.2.1.4. La quantification de la quantité d'eau corporelle totale....36**
     - **1.2.2. Connaissances pratiques des détenteurs d'équidés sur la mesure de l'état corporel et la ration....36**
     - **1.2.3. Constat des pratiques nutritionnelles Européennes....37**

Résumé du Chapitre 1....39

2. **Métabolisme énergétique et ses relations avec les autres fonctions....40**
   - **2.1. Métabolisme glucidique....40**
     - **2.1.1. Les transporteurs du glucose (GLUT)....40**
       - **2.1.1.1. Transporteurs indépendants de l'insuline....41**
       - **2.1.1.2. Transporteurs dépendants de l'insuline....41**

2.1.2. Production d'insuline par le pancréas....42
2.1.2.1. Description de la protéine....42
2.1.2.2. Synthèse et dégradation de l'insuline....42
2.1.2.3. Facteurs nutritionnels, hormonaux et neuronaux stimulant la sécrétion d'insuline.43
2.1.2.3.1. Glucose....43
2.1.2.3.2. Acides aminés....44
2.1.2.3.3. Hormones....45
2.1.2.4. Facteurs physiologiques régulant la sécrétion d'insuline chez le cheval....46
2.1.2.4.1. Développement précoce....46
2.1.2.4.2. Gestation....47
2.1.2.4.3. Vieillissement....47
2.1.3. Effets physiologiques et voies de signalisation de l'insuline....47
2.1.3.1. Structure du récepteur à l'insuline....47
2.1.3.2. Effets physiologiques et voies de signalisation....47
2.1.3.2.1. Régulation du métabolisme cellulaire....48
2.1.3.2.2. Stimulation de la translocation du transporteur GLUT4....48
2.1.3.2.3. Croissance et différenciation cellulaire....48
2.1.3.2.4. Action sur les vaisseaux sanguins....48
2.1.3.2.5. Action sur la croissance osseuse....49
2.1.3.2.6. Action sur la fonction de reproduction....50
2.2. Métabolisme des adipocytes....50
2.2.1. Leptine....50
2.2.1.1. Description....50
2.2.1.2. Synthèse....51
2.2.1.3. Action sur l'appétit....51
2.2.1.4. Action sur le métabolisme énergétique....51
2.2.1.5. Action sur le métabolisme osseux....52
2.2.1.5.1. Système nerveux sympathique....52
2.2.1.5.2. Voies périphériques....53
2.2.1.6. Action sur la fonction de reproduction....54
2.2.1.6.1. Puberté....54
2.2.1.6.2. *Reproduction*....54
2.2.1.6.3. Gestation....55
2.2.2. Adiponectine....55
2.2.2.1. Description....55
2.2.2.2. Synthèse....55
2.2.2.3. Action sur le métabolisme énergétique....56
2.2.2.4. Action sur l'inflammation....56
2.2.2.5. Action sur les vaisseaux sanguins....57
2.2.2.6. Action sur le métabolisme osseux....57
2.2.2.6.1. Système nerveux sympathique....57
2.2.2.6.2. Voies périphériques....57
2.2.2.7. Action sur la fonction de reproduction....58
2.2.2.7.1. Puberté....58
2.2.2.7.2. Reproduction....58
2.2.2.7.3. Gestation....59
2.3. Cytokines pro-inflammatoires....59
2.3.1. Définition....59
2.3.2. Synthèse....60
2.3.3. Action sur le métabolisme énergétique....60
2.3.3.1. TNF-α....60
2.3.3.2. IL-6....61
2.3.3.3. Action sur le pancréas....61
2.3.4. Action sur la croissance osseuse....62
2.3.5. Cytokines pro-inflammatoires, obésité et espèce équine....62

2.4. Métabolisme osseux.....63
2.4.1. Les différents types cellulaires.....63
2.4.2. Croissance des os longs et ossification enchondrale.....64
2.4.3. Hormones stimulant la croissance osseuse.....65
2.4.3.1. Hormones de croissance et IGF-1.....65
2.4.3.2. Hormones thyroïdes.....65
2.4.3.3. Œstrogènes et androgènes.....65
2.4.4. L'ostéocalcine.....66
2.4.4.1. Synthèse.....66
2.4.4.2. Action sur l'os.....67
2.4.4.3. Action sur le métabolisme énergétique.....67
2.4.4.4. Action sur la sensibilité à l'insuline.....67
2.4.4.5. Action sur la production d'insuline.....68
2.4.4.6. Action sur la fonction de reproduction.....68
2.4.4.7. L'ostéocalcine au sein de l'espèce équine.....69
Résumé du Chapitre 2.....70

3. Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD).....71
3.1. Historique et définition du concept.....71
3.1.1. Hypothèse de Barker.....71
3.1.2. Famine Hollandaise.....71
3.1.3. Réponse adaptative prédictive et « second hit ».....72
3.1.4. Mécanismes sous-jacents.....73
3.1.5. Conclusion.....73
3.2. Origines Développementales de la Santé et des Maladies chez les animaux d'intérêt agronomique.....73
3.2.1. Effet du génotype maternel.....74
3.2.2. Effet de l'alimentation maternelle.....74
3.2.2.1. Surnutrition et obésité.....74
3.2.2.2. Sous-nutrition.....76
3.2.3. Effet du métabolisme maternel.....77
3.2.4. Effet de la parité maternelle.....78
3.3. Origines Développementales de la Santé et des Maladies chez l'équin.....78
3.3.1. Influence de l'environnement maternel sur le phénotype de la descendance..78
3.3.1.1. Effet du génotype maternel.....78
3.3.1.1.1. Insémination artificielle entre races de différentes tailles.....78
3.3.1.1.2. Transfert d'embryon entre races de différentes tailles.....79
3.3.1.1.2.1. Croissance restreinte.....79
3.3.1.1.2.2. Croissance amplifiée.....79
3.3.1.1.2.3. Effet des techniques de production des embryons.....80
3.3.1.2. Effet de l'alimentation maternelle.....80
3.3.1.2.1. Surnutrition.....80
3.3.1.2.2. Sous-nutrition.....81
3.3.1.2.3. Enrichissement de la ration avec de l'amidon (céréales).....82
3.3.1.2.4. Enrichissement de la ration avec des acides gras ω-3 (EPA et DHA).....83
3.3.1.2.5. Supplémentation en vitamines, minéraux et acides-aminés (sélénium, cuivre, vitamine E, arginine).....84
3.3.1.2.5.1. Supplémentation en sélénium.....84
3.3.1.2.5.2. Supplémentation en vitamine E.....85
3.3.1.2.5.3. Supplémentation en arginine.....85
3.3.1.3. Effet de l'obésité et des pathologies métaboliques.....86
3.3.1.4. Effet de la parité, de l'âge de la jument et de la saison de reproduction.....86
3.3.1.4.1. Effets sur le phénotype.....86

3.3.1.4.2. Effets sur la performance....88
3.3.1.4.2.1. Taille au garrot....88
3.3.1.4.2.2. Parité et âge de la jument....88
3.3.1.4.2.3. Saison de reproduction....89
3.3.1.5. Conclusion....89
3.4. Le placenta, agent programmateur de la croissance fœtale....90
3.4.1. Le placenta équin....90
3.4.1.1. Durée de gestation....90
3.4.1.2. Mobilité embryonnaire, fixation du conceptus et développement des annexes fœtales....90
3.4.1.3. Implantation du conceptus et développement du placenta....91
3.4.1.3.1. La ceinture chorionique et les cupules endométriales....91
3.4.1.3.2. Le trophoblaste non invasif définitif....92
3.4.1.4. Structure et fonction du placenta définitif....93
3.4.1.4.1. Structure du placenta définitif....93
3.4.1.4.2. Fonction du placenta définitif....94
3.4.1.5. Développement embryonnaire et fœtal....95
3.4.2. Adaptations placentaires et environnement maternel....96
3.4.2.1. Taille de la jument et surface placentaire....96
3.4.2.2. Modifications nutritionnelles maternelles....97
3.4.2.2.1. Surnutrition maternelle et supplémentation en céréales....97
3.4.2.2.2. Sous-nutrition maternelle....97
3.4.2.2.3. Supplémentation en minéraux et acides aminés....98
3.4.2.2.3.1. Supplémentation en sélénium....98
3.4.2.2.3.2. Supplémentation en arginine....98
3.4.2.3. Obésité maternelle et pathologies métaboliques....99
3.4.2.3.1. Chez la femme....99
3.4.2.3.2. Chez la jument....99
3.4.2.4. Parité et âge....100
Résumé du Chapitre 3....101

4. Pathologies métaboliques au sein de la filière équine....102
4.1. Obésité....102
4.1.1. Définition....102
4.1.2. Prévalence de l'obésité au sein de la filière équine....102
4.1.2.1. Les pathologies associées à l'obésité....103
4.1.2.2. Influence de l'état corporel sur les performances sportives....104
4.2. Ostéochondrose....105
4.2.1. Définition et pathogenèse....105
4.2.2. Etiologie et prévalence....105
4.2.3. Ostéochondrose et performances sportives....108
Résumé du Chapitre 4....110

5. Objectifs de la thèse....111

Partie B : Protocoles expérimentaux....113

1. Présentation du projet....114
2. Présentation des modèles expérimentaux....114
2.1. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante....114
2.1.1. Etablissement du modèle....114
2.1.2. Conduite des juments et des poulains....115
2.2. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle....116

2.2.1. Etablissement du modèle....116
2.2.2. Conduite des juments et des poulains....116
2.3. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle....117
2.3.1. Etablissement du modèle....117
2.3.2. Conduite des juments et des poulains....117
3. Structure et fonction du placenta à terme....118
3.1. Prélèvements et mesures à terme....118
3.2. Evaluation de la structure placentaire....119
3.3. Evaluation de la fonction placentaire....120
4. Mensurations et état corporel de la jument gestante et du poulain en croissance....120
4.1. Poids vif et notes d'état corporel des juments gestantes et allaitantes....121
4.2. Mensurations et état corporel des poulains en croissance....121
4.3. Dosage des hormones impliquées dans la croissance....121
5. Métabolisme énergétique chez la jument gestante et le poulain en croissance....121
5.1. Evaluation du métabolisme glucidique....122
5.1.1. Prélèvements sur les animaux....122
5.1.1.1. Frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIVGTT) modifié....122
5.1.1.2. Test de tolerance intraveineux au glucose (IVGTT)....123
5.1.2. Dosages d'insuline....123
5.1.3. Calculs et estimation des indices métaboliques....123
5.1.3.1. Estimation des indices du modèle de Bergman (FSIVGTT)....123
5.1.3.2. Calcul des aires sous courbe pour l'IVGTT....124
5.2. Evaluation du métabolisme lipidique....124
5.3. Evaluation du métabolisme azoté....124
5.4. Evaluation de l'inflammation systémique....125
6. Maturation testiculaire....125
6.1. Castration....125
6.2. Structure des testicules prépubères....125
6.3. Fonction des testicules prépubères....125
7. Lactation....126
7.1. Qualité du colostrum....126
7.2. Profils en acides gras des plasmas de jument et de poulain et du lait jusqu'à 3 mois de lactation....126
8. Statut ostéoarticulaire des poulains....126
8.1. Réalisation des clichés radiographiques....126
8.2. Lecture des clichés radiographiques et diagnostic....127

Partie C : Articles et résultats....128

1. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante....130
1.1. Article 1 : Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years....131

1.2. Article 2 : Placental function and structure at term is altered in broodmares fed with cereals from mid-gestation……143
1.3. Résultats complémentaires : Supplémentation en concentrés et qualité du colostrum à la naissance……156
2. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle……158
2.1. Article 3 : Maternal parity affects placental development, growth and metabolism of foals until 1 year and a half……159
3. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle……175
3.1. Article 4: Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age……176
3.2. Résultats complémentaires : Effet de l'obésité maternelle sur la structure et la fonction placentaire à terme……206
3.2.1. Effet de l'obésité maternelle sur la biométrie foeto-placentaire à terme……206
3.2.2. Effet de l'obésité maternelle sur la structure et la fonction placentaire à terme ……206
3.3. Résultats complémentaires : Effet de l'obésité maternelle sur la qualité du colostrum et du lait jusqu'au 3ème mois de lactation…… ……209
3.3.1. Effet de l'obésité maternelle sur la composition du plasma de jument à terme et du poulain à la naissance……209
3.3.2. Effet de l'obésité maternelle sur la composition du colostrum à la naissance…211
3.3.3. Effet de l'obésité maternelle sur la composition du lait en acides gras jusqu'au sevrage……212
3.3.4. Evolution de la composition du lait en acides gras en fonction du temps de gestation……213
4. Etude annexe aux travaux de thèse : Mise au point d'une méthode alternative pour l'évaluation de l'état corporel de la jument gestante…216
4.1. Protocole de mesure de l'épaisseur de gras sous cutané à la croupe et aux côtes……216
4.2. Mesures échographiques chez la jument non gestante……217
4.3. Mesures échographiques chez la jument gestante……217

Partie D : Bilan, discussion et perspectives……219

1. Synthèse des résultats……220
1.1. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante ……220
1.2. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle……221
1.3. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle……221
1.4. Synthèse générale……222
2. Limites des modèles……223
2.1. Limites générales……223
2.2. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante ……224
2.2.1. Effets confondus de la sous-nutrition et de la qualité de l'alimentation……224
2.2.2. Choix de la période de surnutrition chez la descendance……225

2.2.3. Méthode d'alimentation des poulains.....225
2.3. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle.....226
2.4. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle.....227
2.4.1. Surpoids et obésité.....227
2.4.2. Inflammation systémique et inflammation placentaire.....227
3. Discussion et perspectives.....228
3.1. Performance sportive et reproductive.....228
3.2. Mécanismes physiologiques et épigénétiques sous-jacents.....230
3.2.1. Mécanismes physiologiques.....230
3.2.1.1. Relations entre les différents métabolismes.....230
3.2.1.2. Métabolisme maternel, inflammation placentaire et développement d'ostéochondrose chez le poulain.....231
3.2.2. Mécanismes transcriptionnels et épigénétiques.....232
3.2.2.1. Facteurs de transcription.....232
3.2.2.2. Mécanismes épigénétiques.....233
3.3. Comportement et apprentissage.....234
3.4. Implications pour la filière.....235
4. Conclusion.....237

Bibliographie.....239

Liste des publications relatives aux travaux de thèse

Articles originaux *(* articles issus du projet FOETALIM sans faire directement partie de la thèse)*

Morgane Robles, Camille Gautier, Luis Mendoza, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Jean-Philippe Lejeune, Isabelle Caudron, Isabelle Guenon, Sylvaine Camous, Anne Tarrade, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Hélène Bouraima-Lelong, Pascale Chavatte-Palmer. (2017). **Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years**. PLOS One 12;1:e0169295. DOI: 10.1371/journal.pone.0169295.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, François Piumi, Luc Jouneau, Olivier Bouchez, Marie-Christine Aubrière, Michèle Dahirel, Josiane Aioun, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Placental function and structure at term is altered in broodmares fed with cereals from mid-gestation.** Placenta (accepté avec révisions mineures).

Morgane Robles, *Pauline Peugnet, Sarah Valentino, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Marie-Christine Aubrière, Francis Reigner, Didier Serteyn, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. (2017)* ***Placental alterations in structure and function in intra-uterine growth-retarded horses.*** *Equine Veterinary Journal, In press.*

Morgane Robles, *Pauline Peugnet, Sarah Valentino, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Marie-Christine Aubrière, Francis Reigner, Didier Serteyn, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer.* ***Placental structure and function in different breeds in horses****. Theriogenology (soumis, en révision).*

Morgane Robles, Cédric Dubois, Camille Gautier, Michèle Dahirel, Isabelle Guenon, Hélène Bouraima-Lelong, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Catherine Viguié, Pascale Chavatte-Palmer. **Maternal parity affects placental development, growth and metabolism of foals until 1 year and a half.** Theriogenology (soumis, en révision)

Morgane Robles, Emilie Nouveau, Camille Gautier, Luis Mendoza, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Bénédicte Lagofun, Marie-Christine Aubrière, Jean-Philippe Lejeune, Isabelle Caudron, Isabelle Guenon, Catherine Viguié, Laurence Wimel, Hélène Bouraima-Lelong, Didier Serteyn, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age.** PLOS One (soumis, en révision)

*Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Luis Mendoza, Laurence WImel, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Daniel Guillaume, Sylvaine Camous, Valérie Berthelot, Marie-Pierre Toquet, Eric Richard, Charlotte Sandersen, Stéphane Chaffaux, Jean-Phillipe Lejeune, Anne Tarrade, Didier Serteyn, Pascale Chavatte-Palmer. (2015). **Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre-weaning horses.** PLOS One 10;4:e0122596. DOI: 10.1371/journal.pone.0122596*

Revues

Morgane Robles, Pascale Chavatte-Palmer. (2017). **Does maternal size, nutrition and metabolic status affect offspring production traits in domestic species?** Animal Reproduction 14:3,528-537. DOI: 10.21451/1984-3143-AR996

Pascale Chavatte-Palmer, Pauline Peugnet, **Morgane Robles.** (2017). **Developmental programming in equine species: relevance for the horse industry.** Animal Frontiers 7:48-54. DOI: 10.2527/af.2017-0128

Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. (2016). **Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring.** Theriogenology 86;1:99-109. DOI : 10.1016/j.theriogenology.2016.01.028.

Pascale Chavatte-Palmer, Christophe Richard, Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Delphine Rousseau-Raillard, Anne Tarrade. (2015). **The developmental origins of health and disease : importance for animal production.** Animal Reproduction 12;3:505-520.

Communications orales dans des congrès à comité de lecture

Morgane Robles, Cédric Dubois, Luis Mendoza, Michele Dahirel, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Influence de l'obésité maternelle dès la conception sur la santé métabolique et ostéoarticulaire dans un modèle cheval.** 22èmes journées de la Fédération française d'étude de la reproduction. 13-15/09/2017, Tours, France.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, François Piumi, Luc Jouneau, Marie-Christine Aubrière, Michèle Dahirel, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **La supplémentation en céréales en fin de gestation perturbe la fonction placentaire chez la jument.** 6ème colloque international du Groupe de la Francophonie Placentaire. 07-08/09/2017, Grenoble, France.

Morgane Robles, Cédric Dubois, Luis Mendoza, Michele Dahirel, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Effects of maternal obesity during pregnancy on foals' growth,**

carbohydrate metabolism, systemic inflammation and osteochondrosis until one year of age. 8th European Equine Health and Nutrition Congress (EEHNC). 23-24/03/2017, Anvers, Belgique.

Morgane Robles, Camille Gautier, Pauline Peugnet, Luis Mendoza, Cédric Dubois, Jean-Philippe Lejeune, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Hélène Bouraïma-Lelong, Pascale Chavatte-Palmer. **L'alimentation de la jument en gestation et du poulain en croissance est primordiale pour le bon développement du poulain et sa future carrière sportive et peut-être reproductive : bilan du projet Foetalim 2.** 43ème Journée de la Recherche Equine. 16/03/2017, Paris, France.

Morgane Robles, Emilie Nouveau, Laurence Wimel, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Maternal obesity at conception and insulin sensitivity in late gestation alter placental structure but not fetal biometry at birth in the horse.** 43rd Annual Conference of the International Embryo Technology Society (IETS). 14-17/01/2017, Austin, USA.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, François Piumi, Luc Jouneau, Marie-Christine Aubrière, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **The mares' placenta is able to adapt to a moderate maternal undernutrition during late-gestation to sustain fetal growth.** 8th European Workshop on Equine Nutrition (EWEN). 16-18/06/2016, Dijon, France.

Morgane Robles, Laurence Wimel, Cédric Dubois, Pauline Peugnet, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Importance de l'état corporel périconceptionnel pour le développement de l'unité fœto-placentaire et le métabolisme des poulains chez le cheval**. 45èmes Journées Annuelles de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF). 03-05/11/2015, Saint-Denis, France.

Posters dans des congrès à comité de lecture

Morgane Robles, Camille Gautier, Luis Mendoza, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Jean-Philippe Lejeune, Isabelle Caudron, Isabelle Guenon, Sylvaine Camous, Anne Tarrade, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Hélène Bouraima-Lelong, Pascale Chavatte-Palmer. **Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years.** 3ème congrès de la Société Française des Origines Développementales de la Santé et des Maladies. 01-02/12/2016, Paris, France.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, François Piumi, Luc Jouneau, Marie-Christine Aubrière, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **The mares' placenta is able to adapt itself to a moderate maternal undernutrition during late-gestation to protect fetal growth.** 18th International Congress of Animal Reproduction (ICAR). 26-30/06/2016, Tours, France.

Morgane Robles, Cédric Dubois, Laurence Wimel, Pascale Chavatte-Palmer. **Importance of periconceptional body condition score over nutrition for development of the feto-placental unit and the foal metabolism in horses.** Epiconcept conference 2015 "Epigenetics and periconception". 06-07/10/2015, Hersonissos, Crète.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, François Piumi, Luc Jouneau, Marie-Christine Aubrière, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **The mares' placenta is able to adapt itself to a moderate maternal undernutrition during late-gestation to protect fetal growth.** 32nd Scientific meeting of the Association of Embryo Technology in Europe (AETE). 11-12/09/2015, Ghent, Belgique.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, Laurence Wimel, Michele Dahirel, Daniel Guillaume, Sylvaine Camous, Didier Serteyn, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Effects of maternal nutrition in late-pregnancy on placental structure and function and the neonatal foal's response to glucose.** 7th European Equine Health and Nutrition Congress (EEHNC). 26-27/03/2015, Bruges, Belgique.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. Barley supplementation at mid-gestation in broodmares does not affect fetal development and is accompanied by minimal placental adaptations**.** 41st Annual Conference of the International Embryo Technology Society (IETS). 10-13/01/2015, Versailles, France.

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Barley supplementation at mid-gestation in broodmares does not affect fetal development and is accompanied with minimal placental adaptations.** 2nd congrès de la Société Française des Origines Développementales de la Santé et des Maladies. 06-07/11/2014, Nantes, France.

Liste des illustrations

Liste des figures

Partie A : Introduction

1. Alimenter les équins

Figure A.1. Proportion d'élevage en fonction de l'activité des chevaux en 2015
Figure A.2. Nombre et proportion de poulains (toutes races comprises) immatriculés par région de France en 2015
Figure A.3. Proportion de partants en compétition par discipline en 2015
Figure A.4. Articulation des différents chapitres de l'introduction de la thèse
Figure A.5. Niveaux d'énergie à la base des différents systèmes de nutrition internationaux
Figure A.6. Comparaison des équations de croissance fœtale utilisées comme base pour le calcul des besoins de la jument en gestation
Figure A.7. Bases scientifiques du calcul des besoins en énergie pour la jument gestante
Figure A.8. Evolution du métabolisme de la jument au cours de la gestation
Figure A.9. Etat corporel d'après la note d'état corporelle échelle 0-5
Figure A.10. Echographie de l'épaisseur de gras sous-cutané au niveau de la croupe

2. Métabolisme énergétique et ses relations avec les autres fonctions

Figure A.11. Schéma récapitulatif de l'organisation des différents paragraphes du chapitre « Métabolisme énergétique et ses relations avec les autres fonctions »
Figure A.12. Entrée du glucose dans les cellules et stimulation de la synthèse d'insuline
Figure A.13. Schéma récapitulatif des mécanismes conduisant à la sécrétion d'insuline par la cellule β-pancréatique par stimulation du glucose
Figure A.14. Régulation de la synthèse d'insuline
Figure A.15. Voies de signalisation activées par la liaison de l'insuline à son récepteur dans les cellules exprimant GLUT4
Figure A.16. Actions systémiques de l'insuline
Figure A.17. Stimulation de la synthèse de leptine dans le tissu adipeux et actions systémiques de la leptine
Figure A.18. Stimulation de la synthèse d'adiponectine dans le tissu adipeux et actions systémiques de l'adiponectine

Figure A.19. TNF-α diminue la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques
Figure A.20. Stimulation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux et actions systémiques de ces cytokines
Figure A.21. Organisation de l'os et différents types cellulaires
Figure A.22. Développement osseux par ossification enchondrale
Figure A.23. Coupe transversale schématique du cartilage epiphysaire
Figure A.24. Action de l'insuline sur la sécrétion d'ostéocalcine bioactive
Figure A.25. Facteurs hormonaux régulant la croissance et le remodelage osseux
Figure A.26. Synthèse et action de l'ostéocalcine sur les fonctions métaboliques et de reproduction
Figure A.27. Interactions des métabolismes glucidique, lipidique, osseux, gonadique et de l'inflammation systémique

3. Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD)

Figure A.28. Effets à long terme de l'exposition in utero ou post-natale à la « famine Hollandaise »
Figure A.29. Evolution de la plasticité au cours de la vie, effet d'un environnement délétère ou protecteur sur le risque de développer des pathologies à l'âge adulte
Figure A.30. Modèle représentant l'interaction des facteurs génétiques et environnementaux pré et post-natals impliqués dans le concept de la DOHaD
Figure A.31. Résumé du concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD)
Figure A.32. Résumé de l'effet de l'interaction entre l'état corporel péri-conceptionnel et l'état corporel durant la gestation, effet de l'obésité chez la brebis
Figure A.33. Evolution du poids des poulains Shetland x Shire en fonction du génotype maternel jusqu'à 7 mois
Figure A.34. Evolution de la hauteur au garrot des poulains Shetland x Shire en fonction du génotype maternel jusqu'à 36 mois
Figure A.35. Poids de naissance des poulains en fonction de la parité maternelle
Figure A.36. Schémas représentant le développement précoce des membranes fœtales et de la ceinture chorionique jusqu'à 40 jours de gestation
Figure A.37. Schémas représentant le développement du placenta non invasif et des microcotylédons jusqu'à 150 jours de gestation
Figure A.38. Anatomie du placenta équin à terme, villosités microcotylédonaires à l'extérieur
Figure A.39. Structure du placenta équin à terme
Figure A.40. Structure des microcotylédons à terme
Figure A.41. Structure du trophoblaste histotrophe à terme
Figure A.42. Volume des différents composants placentaires à terme

Figure A.43. Poids des placentas à terme en fonction de la parité maternelle
Figure A.44. Origines Développementales de la Santé et des Maladies et espèce équine

4. Pathologies métaboliques au sein de la filière équine

Figure A.45. Schéma représentatif de l'apparition et l'évolution d'une lésion d'ostéochondrose
Figure A.46. Facteurs précoces influençant le développement des lésions d'ostéochondrose chez le poulain en croissance

Partie B : Protocoles expérimentaux

Figure B.1. Modèle 1 "Effet de la complémentation en concentrés dans la ration"
Figure B.2. Modèle 2 "Effet de la parité"
Figure B.3. Modèle 3 "Effet de l'obésité"
Figure B.4. Placenta en position « F » sous une plaque de plexiglas transparent pour mesure de la surface
Figure B.5. Structure du placenta équin à terme et composants placentaires mesurés par stéréologie
Figure B.6. Déroulement du frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIVGTT) modifié sur les animaux
Figure B.7. Déroulement du test de tolérance intraveineux au glucose (IVGTT) sur les animaux
Figure B.8. Représentation schématique du modèle minimal de Bergman
Figure B.9. Exemple de classification des « lumen score » dans un testicule de poulain prépubère
Figure B.10. Schéma récapitulatif des points anatomiques radiographiés
Figure B.11. Exemple de lésions d'ostéochondrose observées au niveau des articulations des poulains en croissance

Partie C : Articles et résultats

Figure C.1. Qualité du colostrum de juments nourries avec des fourrages uniquement (groupe F) ou avec des concentrés (groupe B) à partir du 7ème mois de gestation
Figure C.2. Volume et surface des différents composants des placentas de juments Normales (N, n=9) ou Obèses (O, n=13)
Figure C.3. Profils en acides gras du plasma à la naissance de poulains nés de juments Normales (N, n=10) ou Obèses (O, n=14)
Figure C.4. Schéma simplifié de l'élongation des acides gras ω-3 et ω-6 et de leurs effets
Figure C.5. Profils en acides gras du colostrum de juments Normales (N, n=10) ou Obèses (O, n=14)

Figure C.6. Profils en acides gras du plasma de poulains nés de juments Normales (N, n=10) ou Obèses (O, n=14) à 1 et 3 mois
Figure C.7. Evolution de la concentration en acides gras dans le lait de jument (A), le plasma de jument (B) et le plasma de poulain (C) de la naissance à 3 mois de lactation (n=24)
Figure C.8. Evolution de la proportion de matière grasse le lait de jument de la naissance à 3 mois de lactation sur l'ensemble des laits de jument analysés sur les dernières années (n=74)
Figure C.9. Evolution du profil en acides gras du lait de juments entre la naissance et 3 mois de lactation
Figure C.10. Mesures échographiques de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané entre les muscles glutéal-biceps et semi-tendineux
Figure C.11. Mesures échographiques de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané entre les au niveau des côtes
Figure C.12. Corrélation entre la mesure d'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané à la croupe mesurée par échographie et la note d'état globale ou à la croupe chez des juments non gestantes
Figure C.13. Cas de juments où la note d'état estimée est très différente de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané mesurée
Figure C.14. Corrélation entre la mesure d'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané à la croupe mesurée par échographie et la note d'état chez des juments gestantes en fonction du stade de gestation
Figure C.15. Corrélation entre la mesure d'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané aux côtes mesurée par échographie et la note d'état chez des juments gestantes en fonction du stade de gestation

Partie D : Bilan, discussion et perspectives

Figure D.1. Résumé des principaux résultats observés pour le modèle 1
Figure D.2. Résumé des principaux résultats observés pour le modèle 2
Figure D.3. Résumé des principaux résultats observés pour le modèle 3
Figure D.4. Hypothèse de mécanisme physiologique proposée pour le modèle 1

Liste des tableaux

1. Alimenter les équins

Tableau 1. Comparaison des systèmes de recommandation nutritionnels INRA (Martin-Rosset, 2012) et NRC (NRC, 2007) pour le maintien, la gestation et la croissance
Tableau 2. Données publiées sur la concentration en protéines plasmatiques totales chez la jument gestante et chez le cheval non gestant
Tableau 3. Méthodes de mesure de l'état corporel, avantages et inconvénients
Tableau 4. Description des différents scores de note d'état sur l'échelle 0-5

2. Métabolisme énergétique et ses relations avec les autres fonctions

Tableau 5. Présentation des principaux transporteurs de glucose et de leur localisation tissulaire
Tableau 6. Résumé des différents facteurs qui influent sur la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans

3. Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD)

Tableau 7. Résumé des études réalisées sur l'effet de la surnutrition chez la brebis sur le développement post-natal de la descendance
Tableau 8. Résumé des études réalisées sur l'effet de la sous-nutrition chez la brebis sur le développement post-natal de la descendance
Tableau 9. Résumé des études réalisées sur l'effet du génotype maternel sur le développement de la descendance en post-natal
Tableau 10. Résumé des études réalisées sur l'effet de la surnutrition maternelle sur le développement de la descendance en post-natal
Tableau 11. Résumé des études réalisées sur l'effet de la sous-nutrition maternelle sur le développement de la descendance en post-natal
Tableau 12. Résumé des études réalisées sur l'effet d'une ration de céréales et de fourrages ou de fourrages uniquement dans la ration maternelle sur le développement de la descendance en post-natal
Tableau 13. Poids de naissance des poulains en fonction de la parité maternelle
Tableau 14. Résumé des études réalisées sur l'effet de la surnutrition chez la brebis sur la structure et la fonction placentaire
Tableau 15. Résumé des études réalisées sur l'effet de la sous-nutrition chez la brebis sur le développement post-natal de la descendance
Tableau 16. Poids placentaire à terme en fonction de la parité maternelle

4. Pathologies métaboliques au sein de la filière équine

Tableau 17. Prévalence d'obésité au sein de la filière équine en fonction des pays, des races, des études et de la définition du surpoids et de l'obésité (ramené à une échelle de 0 à 5 pour pouvoir comparer les différentes études entre elles)
Tableau 18. Prévalence d'ostéochondrose au sein de la filière équine en fonction des pays, des races, de l'âge et des études

Liste des abréviations

9CPB : 9kDa calcium binding protein

AFM : Analyse factorielle multiple

AGNE : Acides gras non estérifiés

AIRg : Réponse aigue du pancréas

Akt : Protéine kinase B

ALA : Acide alpha-linolénique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ACP : Analyse en composantes principales

ATf4 : Activating transcription factor 4

C3G : Crk SH3-binding GNRP

CAP : Cbl associated protein

Cbl : Casitas B-lineage lymphoma

C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein α

CREB : CAMP response element binding

Crk : CT10 regulator kinase

CSO : Concours de saut d'obstacles

DHA : Acide docosahexaénoïque

DI : Indice de disposition

DOHaD : Origines Développementales de la Santé et des Maladies

DPA : Acide docosapentaénoique

EB : Energie brute

eCG : hormone gonadotropine chorionique equine

ED : Energie digestible

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

EM : Energie métabolisable

EN : Energie nette

eNOS : Endothelial nitric oxide synthase

EPA : Acide eicosapenténoïque

ERK : Extracellular-signal regulated kinase

FAT/CD36 : Cluster de différenciation 36

FEI : Fédération équestre internationale

FGF : Fibroblast growth factor

FSIVGTT : Frequently sampled intravenous glucose tolerance test

FOXO : Forkhead box O

G6P : Glucose-6-phosphate

GH : Hormone de croissance

GIP : Peptide insulinotrope dépendant du glucose

GLP-1 : Glucagon-like peptide-1

GO : Gene ontology

GSEA : Gene set enrichment analysis

GSK-3 : Glycogène synthase kinase 3

hCG : Hormone gonadotropine chorionique humaine

ICSI : Injection intracytoplasmique de spermatozoïde

IFCE : Institut Français du Cheval et de l'Equitation

IFN-γ : Interféron gamma

IGF-1 : Insulin-like growth factor 1

IGF-2 : Insulin-like growth factor 2

IgG : Immunoglobulines G

IKK : I kappa B kinase

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse coporelle

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IRS : Insulin receptor substrate

IVGTT : Test de tolérance au glucose intraveineux

JNK : Janus kinase

Jpo : Jour post-ovulation

KEGG : Kyoto encyclopaedia of genes and genomes

LA : Acide linoléique

LH : Hormone lutéinisante

LPL : Lipoprotéine lipase

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

mTOR : Mammalian target of rapamycin

NE : Note d'état

NFκB : Nuclear factor κ B

NO : Monoxyde d'azote

NRC : National Research Council

OPG : Ostéoprotegerine

OST-PTP : Osteoarticular protein tyrosine phosphatase

PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase-1

PGC1α : PPARγ co-activator 1α

PI3K : Phospho-inositol-3-kinase

PIP3 : phosphatidylinositol-3-phosphate

PKC: Protéine kinase C

PPARγ : Peroxisome proliferator-activated receptor

PV : Poids vif

Rankl: Receptor activator of NFκB ligand

RE : Reticulum endoplasmique

RIA : radioimmunologie

RNAseq : RNA sequencing

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SAA : Sérum amyloïde A

Sg : Efficacité du glucose

SI : Sensibilité à l'insuline

SIRE : Système d'information relatif aux équidés

SLC2 : Solute Carrier Family 2

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

TCIRG1 : T-cell immune regulator 1

TG : Triglycérides

TGF-β : Transforming growth factor beta

TNFα : Facteur de nécrose tumorale

TSH : Thyréostimuline

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Partie A : Introduction

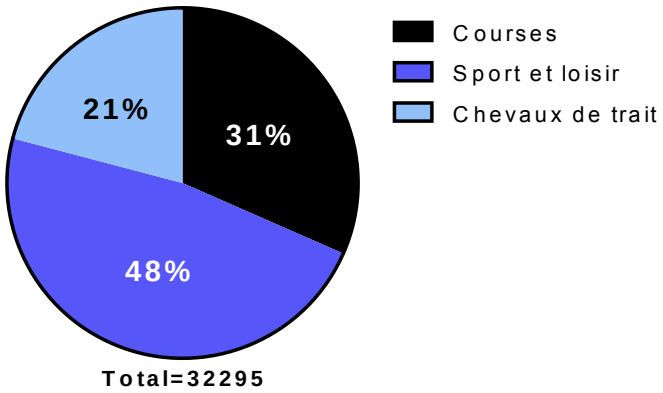


Figure A.1: Proportion d'élevage en fonction de l'activité des chevaux en 2015
Les chevaux de trait sont utilisés à la fois pour le travail et la viande.
Le nombre d'éleveurs est calculé en fonction de la race produite, si un éleveur produit deux races différentes, il sera alors compté une fois pour chaque race. *D'après REFErences, (2016).*

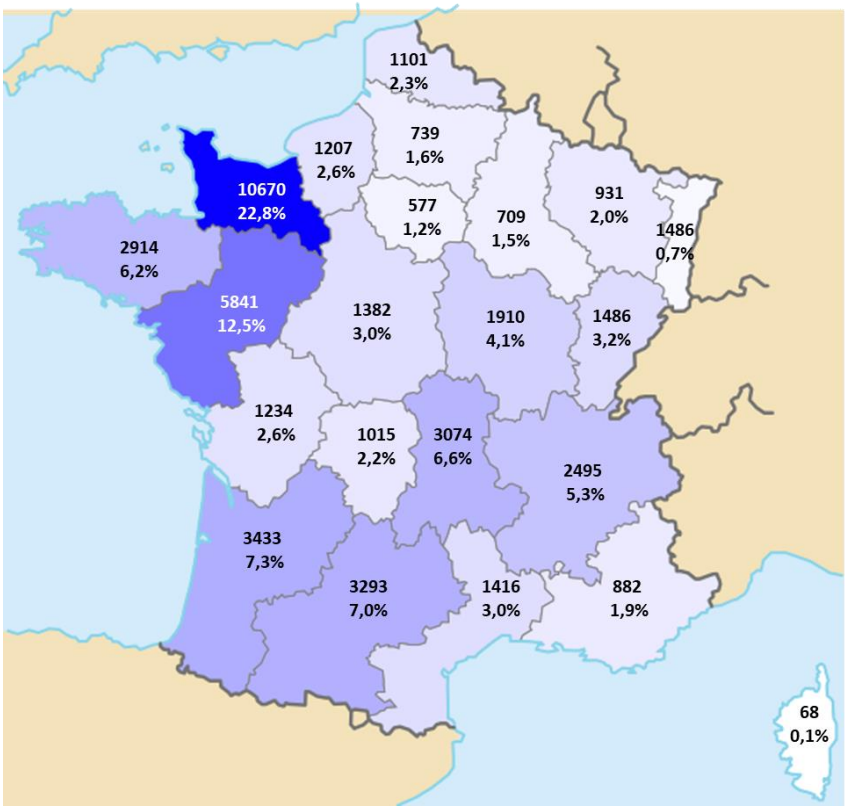


Figure A.2: Nombre et proportion de poulains (toutes races comprises) immatriculés par région de France en 2015 *D'après REFErences, (2016).*

Introduction générale

Depuis la révolution industrielle et le passage de l'énergie d'origine animale à une énergie motorisée, l'usage du cheval est devenu de plus en plus associé aux sports et loisirs. L'économie de la filière équine repose donc désormais en grande partie sur les capacités sportives et athlétiques des chevaux. En effet, en Europe aujourd'hui, les activités équines principales de la majorité des pays Européens sont les disciplines de sport et loisir (World Horse Welfare et Eurogroup 4 Animal, 2015).

D'après les estimations de « Eurogroup for Animals » et « World Horse Welfare » pour la commission Européenne, la France était en 2015 le pays qui possédait le plus de chevaux en Europe (World Horse Welfare et Eurogroup 4 Animal, 2015). D'après l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation, (IFCE) la France comptait 1 106 000 équidés fin 2014 pour près de 14 milliards d'euros de flux générés par les activités équines (REFErences, 2016a). En 2015, la France comptait 31 328 éleveurs, dont 80% ne possédait qu'une ou deux juments pour 71 936 juments saillies et 46 860 poulains immatriculés (REFErences, 2016a, b). Ce chiffre diminue depuis 2005 pour les chevaux de trait et depuis 2010 pour les races de selle (REFErences, 2016b). Quatre éleveurs français sur dix sont situés entre la Basse-Normandie, les Pays de la Loire et la Bretagne et 1 poulain sur 2,4 est né en Basse-Normandie, Pays de la Loire ou Bretagne (REFErences, 2016b). La Figure A.1 présente la proportion d'élevages en fonction des sous-filières. Le cheval de trait est utilisé principalement pour le travail et la viande, ainsi ces deux sous-filières n'ont pas pu être distinguées. La Figure A.2 présente le nombre de poulains (toutes races comprises) immatriculés par région française.

Aujourd'hui en France, la filière équine est structurée en trois sous-filières, qui correspondent aux différentes utilisations des chevaux :

La filière viande est en nette diminution depuis 1997. En 2015, 15% des foyers français étaient consommateurs de viande équine, la consommation de viande chevaline a diminué de 46% depuis 2005 (REFErences, 2016b). Associé à ces diminutions de consommation, le nombre de poulains de trait nés en France est en baisse (de 11 498 nés en 2006 à 6 748 poulains nés en 2015, soit -4750 poulains) depuis 2005 (REFErences, 2016b).

La filière course. La filière course est séparée en deux : les courses de trot (attelé ou monté) et les courses de galop (plat ou obstacle).
En France, les chevaux Trotteurs Français ont une carrière sportive relativement longue (jusqu'à maximum l'âge de 10 ans) et doivent passer des tests de qualification (test d'aptitude chronométré) pour pouvoir courir. Les tests sont ouverts dès l'âge de 2 ans et jusqu'à 5 ans. Pour les poulains nés en 2011, 54% des trotteurs qualifiés l'ont été à 2 ans, contre 41% à 3 ans et 4% à 4 ans (REFErences,

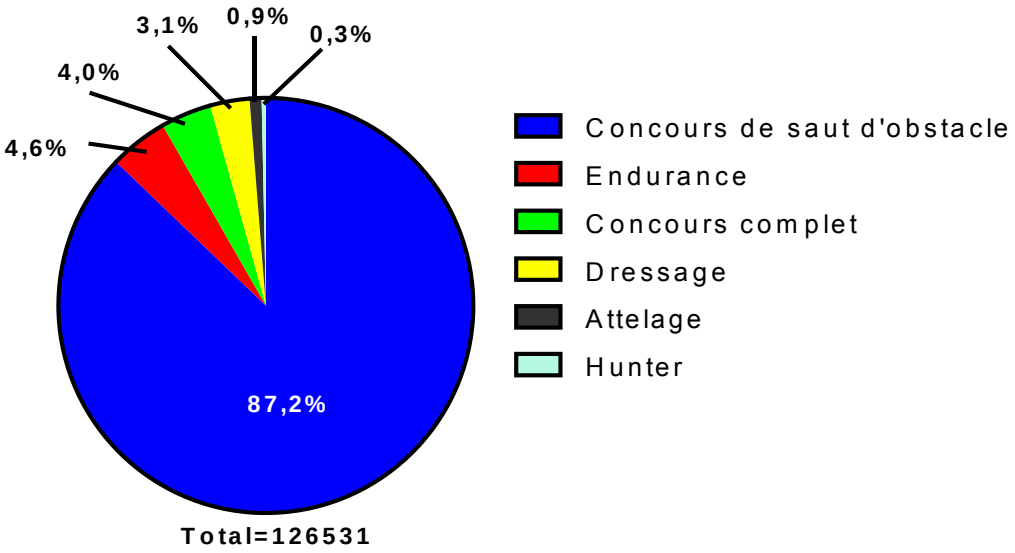


Figure A.3: Proportion de partants en compétition par discipline en 2015
D'après REFErences, (2016).

2016b). Lors des ventes aux enchères de 2015 (agence ARQANA, Association des Eleveurs de Trot du Centre-Est, Association des trotteurs de Caen), 59% des animaux vendus étaient des « yearlings » (poulains âgés d'1 an), 25% des chevaux à l'entrainement de 2 ans ou plus, le reste étant composé de « foals », juments et étalons (REFErences, 2016b). La majorité des Trotteurs Français est élevée en Basse Normandie (47%) et dans les Pays de la Loire (25%) (REFErences, 2016b).
Les chevaux galopeurs peuvent commencer à courir à 2 ans, ils ont une carrière de compétition plus courte que les Trotteurs (jusqu'à 4/5 ans environ). Lors des ventes aux enchères de 2015 (agences ARQANA et OSARUS), les « yearlings » constituaient 43% des ventes, contre 25% pour les chevaux à l'entrainement de 2 ans et plus, le reste étant composé de « foals », poulinières et étalons. La majorité des Pur-Sang Anglais est élevée en Basse-Normandie (81%) (REFErences, 2016b).
En France, 9 292 milliards d'euros ont été pariés en course (REFErences, 2016b). La filière course génère ainsi chaque année près de 11 milliards d'euros de chiffre d'affaire.

La filière sport-loisir-travail. Les filières sport, loisir et travail sont organisées par des acteurs communs et sont donc considérées comme une seule et même filière par l'IFCE. En 2015, 82% des chevaux étaient achetés pour un objectif de sport, loisir et travail, contre 9% pour un objectif de courses et 9% pour un objectif d'élevage (REFErences, 2011). La filière sport comprend les disciplines sportives olympiques et mondiales de la Fédération Equestre Internationale (FEI) pratiquées en compétition telles que le saut d'obstacle, le dressage, le concours complet, la course d'endurance, l'attelage, le reining et la voltige (Fédération Equestre Internationale, 2015). En France, les sports d'équipe (horse-ball, pony-games et polo) et les disciplines culturelles (équitation Camargue, islandaise, western, doma vaquera, hunter, TREC, Equifun, Equifeel, chasse à courre, bajutsu et ski-joëring) sont également pratiquées en compétition (Fédération Française d'Equitation, 2017). Les activités de loisirs elles, sont pratiquées sans objectif de compétition.

Les chevaux et poneys de sport sont valorisés plus tard que les chevaux de course, à partir de 4 et 6 ans dans des compétitions dédiées (concours jeunes chevaux de la Société Hippique Française). 87% des partants concourent en saut d'obstacle (Figure A.3). Les ventes aux enchères contribuent beaucoup moins à la vente de chevaux dans la filière sport que dans la filière course. En 2015, plus d'1/4 des poulains Selle Français naissaient en Basse-Normandie contre une majorité de poulains nés dans le sud de la France pour les autres races de chevaux de selle françaises et étrangères (REFErences, 2016b). Les poneys de selle naissaient en majorité en Basse-Normandie, dans les Pays de la Loire et en Aquitaine (REFErences, 2016b).
L'équitation est le 3ème sport national Français derrière le football et le tennis (REFErences, 2016a, b). En accord avec la discipline principale de valorisation des poulains, le saut d'obstacle est la discipline prédominante en compétition (68% des compétitions en 2015) (REFErences, 2016b).

Les capacités athlétiques des chevaux sont la résultante de nombreux paramètres plus ou moins maîtrisables, parmi lesquels la génétique, la santé, l'entrainement, la nutrition ou encore le cavalier. De plus, dans certaines disciplines telles que les courses hippiques, les chevaux commencent leur carrière sportive alors même qu'ils sont encore en pleine croissance. Ainsi, les poulains doivent avoir un développement optimal pour leur permettre de soutenir une carrière sportive souvent intense et longue et parfois précoce. Les animaux de haute valeur génétique ayant réalisé de grandes performances sont également utilisés pour la reproduction. L'éleveur attend donc de ces animaux qu'ils produisent eux-mêmes, dans de bonnes conditions, des descendants performants.

Les modifications de l'environnement maternel affectent le développement de l'unité fœto-placentaire et peuvent augmenter la susceptibilité de développer des pathologies non transmissibles à l'âge adulte (*i.e.* diabète de type II, syndrome métabolique, pathologies cardiovasculaires, obésité). C'est le concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD en anglais, pour *Developmental Origins of Health and Diseases*). Initialement démontré à partir d'études épidémiologiques chez l'homme, elle peut s'appliquer à l'animal de rente (Chavatte-Palmer *et al.*, 2016; Peugnet *et al.*, 2016a). Ainsi les conditions d'élevage, telles que le métabolisme et l'état physiologique de la jument gestante ou encore les techniques de production des embryons vont pouvoir affecter le développement de l'unité fœto-placentaire, puis la croissance du poulain ou encore sa santé à l'âge adulte et donc potentiellement ses futures performances. Si ce qui était une hypothèse, il y a une vingtaine d'année, est aujourd'hui démontré chez l'homme et de nombreux modèles animaux, peu de travaux ont été réalisés au sein de l'espèce équine. Or cette problématique est aujourd'hui essentielle car une mauvaise gestion de la poulinière et/ou du poulain pourrait altérer durablement le potentiel génétique du futur athlète.

L'introduction des travaux de thèse sera principalement consacrée à l'espèce équine. Lorsque les études n'ont pas été réalisées dans cette espèce, les données issues des études réalisées d'abord sur les animaux de rente puis sur les modèles biomédicaux seront présentées.

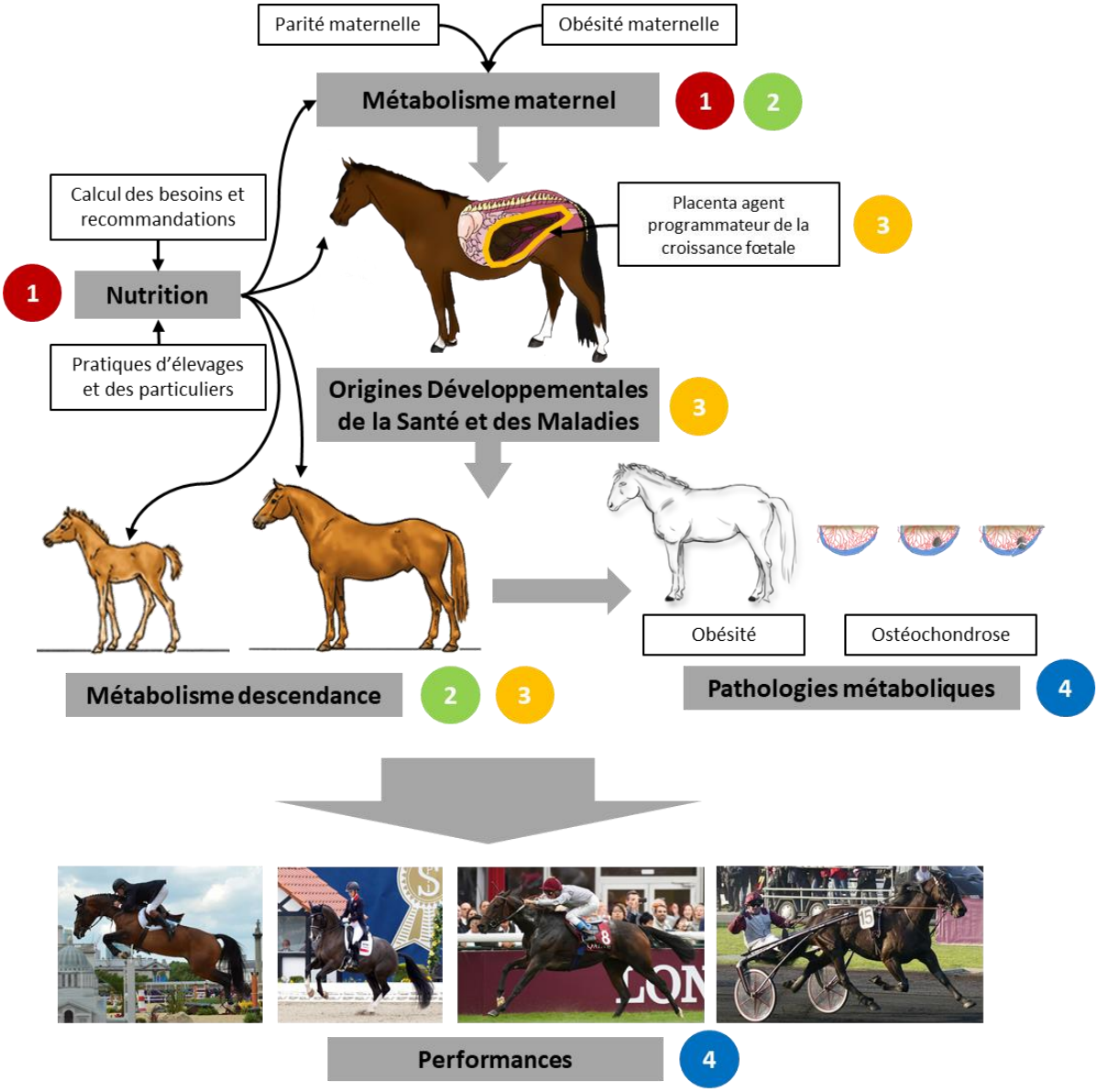


Figure A.4: Articulation des différents chapitres de l'introduction de la thèse

Chaque chiffre correspond au numéro de chapitre dans lequel le sujet est présenté:

1. Alimenter les équins
2. Métabolisme énergétique et ses relations avec les autres fonctions
3. Origines Développementales de la Santé et des Maladies
4. Pathologies métaboliques chez les équins

Certains sujets sont couverts par plusieurs chapitres.

L'introduction est articulée de manière suivante (Figure A.4)

1. Une présentation des bases scientifiques des calculs des besoins et de recommandations alimentaires au sein de l'espèce équine ainsi qu'une revue des pratiques sur le terrain et des méthodes d'évaluation de l'état corporel des chevaux.
2. Une revue non exhaustive des différents métabolismes (glucidique, lipidique et osseux), des hormones impliquées et de leurs rôles respectifs. En effet, les différents métabolismes fonctionnent de manière interconnectée au sein d'un organisme et l'altération de la physiologie d'une fonction de l'organisme va conduire à l'altération de nombreuses autres fonctions.
3. Une présentation du concept des Origines Développementales de la santé et des Maladies, du rôle de l'environnement maternel sur le développement et la santé de la descendance jusqu'à l'âge adulte mais également du rôle du placenta comme agent programmateur du développement et de la croissance fœtale, à l'interface entre la mère et le fœtus.
4. Une présentation des maladies métaboliques qui peuvent avoir une origine précoce et de leur implication en termes de performance et de santé au sein de la filière équine.

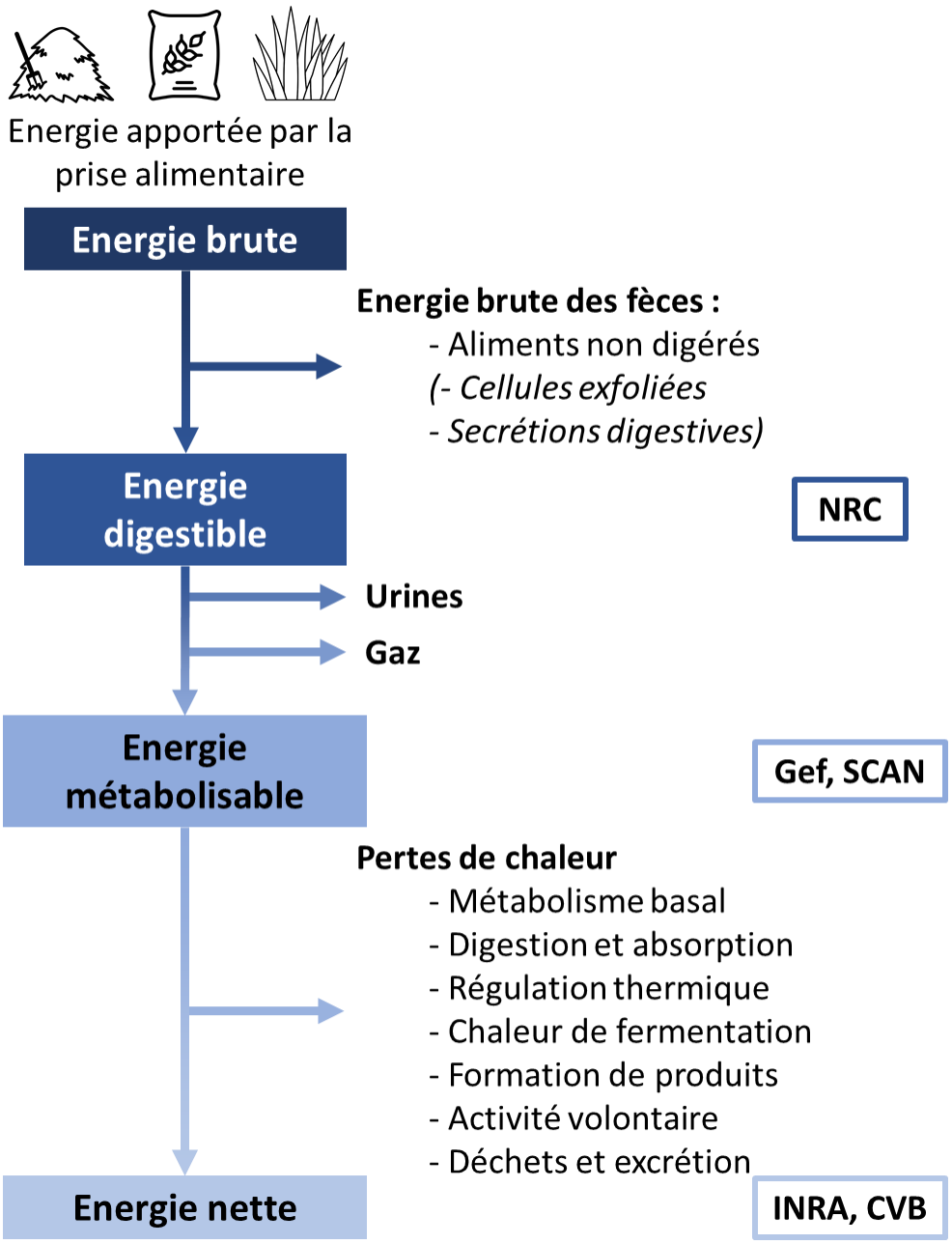


Figure A.5: Niveaux d'énergie à la base des différents systèmes de nutrition internationaux
L'énergie brute correspond à la mesure directe de la quantité de chaleur produite par la combustion des aliments distribués au cheval. L'énergie digestible se calcule en soustrayant de l'énergie brute l'énergie non digérée, en mesurant l'énergie contenue dans les fèces. Elle est à la base du système NRC (Etats-Unis). L'énergie métabolisable est calculée en soustrayant de l'énergie digestible l'énergie perdue dans les urines et les gaz. Elle est à la base des systèmes GeF (Allemagne) et SCAN (Scandinavie). L'énergie nette est l'énergie restante utilisable par l'animal pour ses besoins de maintien, de production et d'exercice. Elle se calcule en soustrayant de l'énergie métabolisable, les pertes de chaleurs dues au fonctionnement de l'organisme (métabolisme), à l'activité volontaire et à la chaleur de fermentation. Elle est à la base des systèmes INRA (France) et CVB (Pays-Bas). *D'après NRC (2007), Martin-Rosset (2012) et Geor et al., (2013).*

1. Alimenter les équins

1.1. Bases scientifiques des calculs de besoins

1.1.1. Niveaux d'énergie

Actuellement, il existe dans le monde 5 systèmes différents de recommandations nutritionnelles au sein de l'espèce équine. Parmi ces 5 systèmes, 4 ont été développés en Europe et le 5ème a été développé aux Etats-Unis. Du fait des évolutions de la compréhension de la physiologie et des besoins des animaux, ces systèmes ont beaucoup évolué depuis leur création et sont toujours en évolution. De ce fait, il ne sera ici présenté que les dernières éditions pour chaque système. Ce travail de thèse se basant sur l'apport en énergie aux animaux et non pas sur l'apport en azote, il ne sera présenté ici que les différences d'apport en énergie entre les différents systèmes de recommandation.

Les différents systèmes de recommandation sont basés sur des calculs de niveaux d'énergie différents (NRC, 2007; Martin-Rosset, 2012; Geor *et al.*, 2013) (Figure A.5) :

- L'énergie brute (EB) correspond à la quantité de chaleur produite par la combustion totale des aliments ingérés par l'animal, mesurée par un appareil appelé bombe calorimétrique. Ce niveau d'énergie n'est pas utilisé comme base des systèmes d'alimentation car il ne prend en compte que la valeur énergétique de l'aliment, sachant que tous les composants d'un aliment ne sont pas digestibles.
- L'énergie digestible (ED) peut être calculée de deux manières :
    - L'énergie digestible apparente est calculée en mesurant la quantité d'énergie perdue dans les fèces et donc la quantité d'énergie non digérée. Cependant, l'énergie contenue dans les fèces comprend, en plus des aliments non digérés, les cellules exfoliées du tractus intestinal (cellules de l'animal et du microbiote intestinal) ainsi que les sécrétions digestives.
    - L'énergie digestible *stricto sensu* est calculée uniquement si les pertes fécales endogènes seules sont connues. Comme il est très difficile de déterminer la proportion de pertes fécales endogènes (utilisation de marqueurs), l'énergie digestible apparente est celle utilisée.

    Le système Anglo-saxon NRC (National Research Council) base ses calculs de valeurs et de besoins nutritionnels sur l'énergie digestible (Mcal/kg) (NRC, 2007)**.**
- L'énergie métabolisable (EM) est calculée en soustrayant de l'ED l'énergie perdue dans les urines et par les gaz. Le calcul de ce niveau d'énergie requiert l'utilisation de chambres

métaboliques (Vermorel *et al.*, 1991), technique lourde et coûteuse. **Ce niveau d'énergie est à la base des systèmes de recommandation Allemands (Gfe) et Scandinaves (SCAN)** (Austbø, 2004; Coenen *et al.*, 2011; Jansonn, 2011; GeF *et al.*, 2014)**.**

- L'énergie nette (EN) prend en compte les pertes de chaleur dues au métabolisme basal, à la digestion et à l'absorption, à la régulation thermique, à la chaleur de fermentation, à la formation de produits, à l'activité volontaire et à la production de déchets et à l'excrétion (définies par le terme « extra-chaleur »). L'énergie ainsi restante peut être utilisée par l'animal pour la production et/ou le sport. **L'énergie nette est à la base des systèmes Français (INRA), Belges et Néerlandais (CVB)** (Martin-Rosset, 2012; CVB, 2016)**.**

Les besoins nutritionnels sont calculés en fonction du poids de l'animal, de sa catégorie (maintenance, production ou travail) et de son état physiologique (croissance, gestation, lactation ou étalon). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement aux besoins de maintenance, de la gestation et de la croissance. De plus, le système le plus utilisé dans le monde étant le système NRC (d'après le nombre de publications associées) et le système français étant le système INRA, nous nous intéresserons uniquement à la comparaison entre ces deux systèmes.

1.1.2. Besoins de maintenance

L'énergie de maintenance ou d'entretien est considérée dans chaque système comme l'énergie permettant à l'animal de se maintenir dans un état stable (poids vif et note d'état) sans exercice, production, croissance ou travail, dans un environnement de thermoneutralité (Coenen *et al.*, 2011; Martin-Rosset, 2012; Geor *et al.*, 2013). Elle est calculée à partir du poids métabolique de l'animal qui correspond au poids vif (PV) élevé à la puissance 0,75 ($PV^{0,75}$). Le poids métabolique prend en compte le fait que les dépenses d'entretien et la capacité d'ingestion varient moins que le poids vif (lorsque le poids vif est multiplié par 2, les dépenses d'entretien sont seulement multipliées par 1,7) (NRC, 2007; Martin-Rosset, 2012).

1.1.3. Besoins de la croissance fœtale et de la gestation

1.1.3.1. Croissance fœtale

Il existe peu de travaux expérimentaux sur la croissance fœtale chez le cheval. Ces travaux sont anciens (la plupart des études ont été réalisées avant 1978, une seule étude date de 2005) et une grande majorité d'entre eux sont basés sur des animaux avortés ou mort-nés pour en déduire la courbe de croissance fœtale en gestation (Dusek, 1966; Meyer et Ahlswede, 1976; Platt, 1978; Giussani *et al.*, 2005). Les deux systèmes de recommandation se basant sur ces données expérimentales sous-estiment très certainement la croissance fœtale en fin de gestation (NRC, 2007). Cependant, les

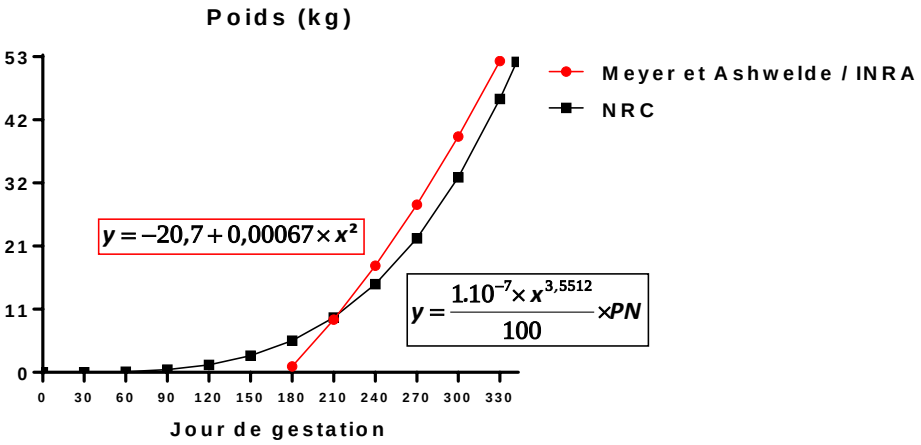


Figure A.6: Comparaison des équations de croissance pondérale fœtale du cheval de selle utilisées comme base pour le calcul des besoins de la jument en gestation

Le poids de naissance du poulain est fixé à 53 kg. Ainsi la durée de gestation prédite par l'équation de Meyer et Ashwelde est de 330 jours tandis qu'elle est de 342 jours d'après l'équation NRC.

L'équation utilisée par Meyer et Ashwelde en 1976 est : $y=-20,7 + 0,00067*x^2$

L'équation utilisée par le système NRC en 2007 est: $y=(1.10\text{-}7*x^{3,5512})/100$ * Poids de naissance (PN)

y correspond au poids du poulain (kg) et x à la durée de la gestation en jours.

Il n'a pas été possible de représenter la courbe pour le système INRA car il doit y avoir une faute de frappe dans l'équation proposée par ce système qui ne donne pas de résultats cohérents.

D'après Meyer et Ashwelde (1976), NRC (2007), INRA (2012).

modèles mathématiques de croissance fœtale dérivés de ces systèmes ne sont pas identiques. L'équation à la base du calcul du gain de poids fœtal est donc également différente. La Figure A.6 montre la différence de poids fœtal théorique entre ces différents systèmes en prenant en référence la courbe proposée par Meyer et Ahlswede (1976).

Le système INRA se base sur une équation développée à partir des résultats de Douglas et Ginther, (1975) pour des poneys, de Meyer et Ahlswede (1976), pour des chevaux de selle et de Martin-Rosset (non publié) pour des chevaux de trait pour calculer la croissance pondérale fœtale pendant les 100 derniers jours de gestation. Cette équation adopte la forme de courbe de croissance développée chez les bovins en 1978 (Eley *et al.*, 1978). D'après Martin-Rosset et Doreau, (1984), l'équation est :

$$Y = -1{,}99 + 13{,}67\,X - 37{,}38\,X^2 + 45{,}51\,X^3 - 18{,}32\,X^4$$

Y étant le rapport du poids du fœtus divisé par le poids de naissance du poulain et X le rapport de l'âge gestationnel depuis la conception en jours divisé par la durée moyenne de gestation, considérée de 340 jours. Seulement, cette équation, une fois utilisée, ne donne pas les résultats attendus, il semble ainsi qu'il y ait une faute de frappe dans l'équation. La croissance fœtale calculée par le système INRA ne peut donc être présentée en Figure A.6. Les chiffres utilisés pour considérer le pourcentage de gain de poids fetal en fin de gestation par le système INRA sont très proches de ceux calculés par l'équation de Meyer et Ahlswede, (1976), de plus les quantités d'énergie et de protéines contenus dans le fœtus ont été calculés à partir des mêmes travaux, c'est pourquoi nous considèrerons que le système INRA se base sur cette équation (Martin-Rosset *et al.*, 1994; Martin-Rosset, 2012).

1.1.3.2. Besoins gestationnels

1.1.3.2.1. Système INRA

Pour calculer les besoins en gestation, **le système INRA** se base sur les quelques rares et anciennes études réalisées sur l'évolution pondérale du tissu utérin, placentaire et fœtal (Barone et Monnet, 1955; Den Engelsen, 1966; Dusek, 1966; Douglas et Ginther, 1975; Meyer et Ahlswede, 1976).
D'après ces différentes études, le gain de poids fœtal est très faible jusqu'au 7ème mois de gestation et son augmentation est presque linéaire lors du dernier mois de gestation (environ 400g/j pour les races de selle) (Figure A.6). De plus, le poids des annexes fœtales (placenta et amnios) et des tissus maternels (utérus et mamelle) représente 70% du poids du fœtus à mi- gestation et 45% au poulinage (Douglas et Ginther, 1975; Coenen *et al.*, 2011). Le système INRA prend également en compte l'augmentation du poids des liquides fœtaux (Arthur, 1969).

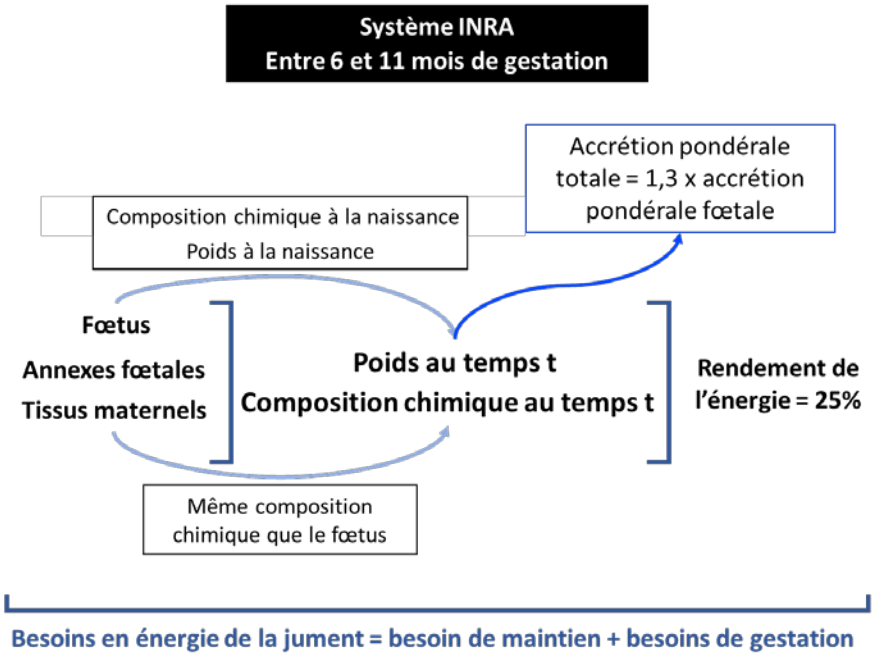


Figure A.7: Bases scientifiques du calcul des besoins en énergie pour la jument gestante
Entre 6 et 11 mois de gestation, pour calculer les besoins spécifiques de la jument en gestation, le système INRA prend en compte:

- La croissance pondérale du fœtus, des annexes fœtales et des tissus maternels : la croissance pondérale de l'ensemble étant égale à 1,3 x celle du fœtus.
- La composition chimique du fœtus, des annexes fœtales et des tissus maternels.
- Le fait que le rendement d'utilisation de l'énergie est de 25% dans ces tissus.

D'après INRA (2012).

Enfin, ce système considère que les annexes fœtales et les tissus maternels ont la même composition chimique que le fœtus au même stade de gestation. La composition chimique du conceptus est alors calculée à partir (Figure A.7) :

- De la composition chimique du fœtus à la naissance (Meyer et Ahlswede, 1976)
- Du poids du fœtus et des annexes en fonction des différents stades de gestation
- Ce système considère aussi que le rendement d'utilisation de l'énergie est de 25% dans le conceptus et les tissus maternels, d'après une moyenne des résultats obtenus chez les bovins, ovins et porcins (Vermorel *et al.*, 1984; Martin-Rosset *et al.*, 1994).
- De l'évolution du poids des annexes fœtales et des tissus maternels, entre 6 et 11 mois de gestation, correspond respectivement à 20% et 10% de l'évolution du poids du fœtus et donc que l'évolution du poids de la totalité de ces tissus est 1,30 fois plus importante que celle du fœtus seul. Ces calculs ont été réalisé à partir des données existantes sur la croissance et l'accrétion des nutriments dans le fœtus, les annexes fœtales et tissus maternels chez le cheval (Barone et Monnet, 1955; Douglas et Ginther, 1975; Meyer et Ahlswede, 1976) et chez le bovin (Jarrige *et al.*, 1978).
- Que le poids de fœtus à la naissance correspond à $0,45*PV^{0,75}$ du poids de la jument (Martin-Rosset, 2012).

Les travaux sur la comparaison entre des juments gestantes et des juments vides, par rapport à la digestibilité et la capacité d'ingestion ont été réalisés sur des juments de races lourdes (Martin-Rosset *et al.*, 1990). Je n'ai pas pu trouver à l'heure actuelle de données validant les calculs de besoins pour le système INRA chez la jument de selle gestante. Les travaux ont été principalement réalisés sur les besoins des juments lourdes en lactation (Doreau *et al.*, 1988).

1.1.3.2.2. Système NRC

Le système NRC se base sur des études semblables à celles de du système INRA, évaluant l'accrétion de tissu utérin et placentaire et la croissance fœtale au cours de la gestation (Meyer et Ahlswede, 1976; Platt, 1978; Giussani *et al.*, 2005). Ce système considère que l'accrétion des tissus utérins et placentaires se déroule durant le deuxième trimestre de gestation (Ginther, 1992). De plus, le système NRC considère que le développement utérin est parallèle au développement placentaire et que ce développement est linéaire, comme chez la vache (Bell *et al.*, 1995). Le poids du poulain à la naissance est fixé à 9,7% du poids vif de la mère. Le système NRC considère les tissus utérins et placentaires comme métaboliquement plus actifs que le reste de l'organisme (Fowden *et al.*, 2000a) et donc comme ayant des besoins de maintenance plus élevés (66,6kcal/kgPV contre 33,3kcal/kgPV pour l'organisme entier). Le système NRC considère enfin que le coût énergétique du dépôt de tissu fœtal et placentaire durant la gestation est de 60 % (NRC, 1989).

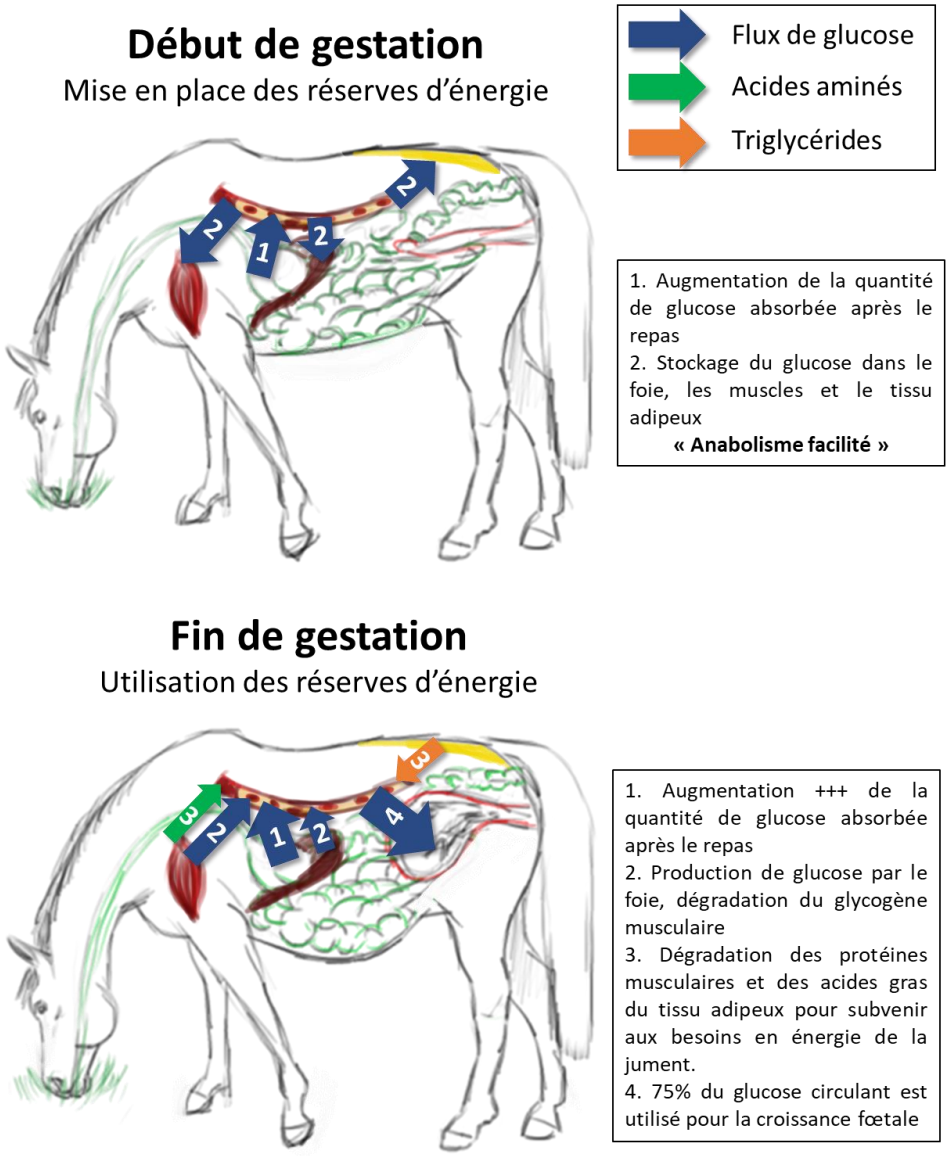


Figure A.8: Evolution du métabolisme de la jument au cours de la gestation
Les modifications du métabolisme glucidique, protéique et lipidique permettent à la jument de subvenir aux besoins du fœtus tout en ayant disponibilité alimentaire limitée en hiver.

De plus, les systèmes INRA et NRC ne prennent pas en compte les mêmes critères physiologiques (composition corporelle du fœtus pour le système INRA, focus sur le besoin de maintenance plus important du conceptus et de l'utérus pour le système NRC) pour réaliser les calculs de besoins. Ainsi, les résultats des calculs sont différents. Le tableau 1 présente les différentes équations pour calculer les besoins de maintenance et de gestation entre les systèmes NRC et INRA.

1.1.3.3. Facteurs supplémentaires non pris en compte dans les calculs de besoins

1.1.3.3.1. Métabolisme de la jument gestante

Le métabolisme de la jument en gestation est différent de celui d'un individu non gestant (Figure A.8).

1.1.3.3.1.1. Métabolisme glucidique

Chez l'humain, la femme enceinte présente une meilleure capacité à stocker les nutriments ingérés que la femme qui ne l'est pas. Cet état est connu sous le nom « d'anabolisme facilité » (Freinkel *et al.*, 1974).

De la même manière, la jument, en début de gestation :

- Devient plus efficace pour absorber le glucose ingéré, ce qui se traduit par une augmentation plus importante de la glycémie post-prandiale (Fowden *et al.*, 1984a).
- A une meilleure réponse des cellules β-pancréatiques, qui se traduit par une augmentation de la sécrétion d'insuline post-prandiale ainsi que par une hyperinsulinémie basale par rapport à un animal non gestant (Fowden *et al.*, 1984a).

Cela signifie que la jument dédie cette première partie de gestation au stockage du glucose dans les tissus périphériques.

En fin de gestation, la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose des tissus périphériques ainsi que la sensibilité des cellules β-pancréatiques diminuent, associés à une très forte augmentation de l'absorption du glucose après les repas (Fowden et al., 1980, 1984; Doreau et al., 1981; Hoffman et al., 2003; George et al., 2011; Peugnet et al., 2015; Beythien et al., 2017). Ces adaptations physiologiques coïncident avec une augmentation très forte des besoins en glucose du fœtus et du placenta en fin de gestation (Fowden *et al.*, 2000b). En effet, près de 75% de la quantité de glucose maternel circulant est utilisé par l'utérus, les annexes fœtales et le fœtus (Fowden *et al.*, 2000b).

Ainsi, la jument en fin de gestation a un métabolisme qui lui permet de rediriger le plus de glucose possible vers le fœtus pour subvenir à ses besoins de pleine croissance.

1.1.3.3.1.2. Métabolisme lipidique

Tableau 1. Comparaison des systèmes de calculs de besoins nutritionnels INRA (Martin-Rosset, 2012) et NRC (NRC, 2007) pour le maintien, la gestation et la croissance

Ce tableau présente les équations permettant de calculer les besoins des animaux pour chaque statut physiologique, les valeurs de recommandation en UFC (INRA) et énergie digestible (NRC).

		Equation	Valeur recommandée pour un individu de 500 kg à l'âge adulte
Système INRA exprimé en énergie nette, Unité Fourragère Cheval (1 UFC = 2250 kcal/kg)			
Maintien		$0.0373*PV^{0.75}$ (majoré de 5% pour cheval de selle)	4.1
Gestation	Avant 5 mois	$((0.373*PV^{0.75}) + (Y*a*EB*km/kp))/9.42$	4.1
	5 mois		4.1
	6 mois		4.4
	7 mois		4.7
	8 mois		4.9
	9 mois		5.1
	10 mois		5.4
	11 mois		5.5
Croissance			
Système NRC exprimé en énergie digestible (Mcal/kg)			
Maintien		0.0333*PV	16.65
Gestation	Avant 5 mois	(0.033*PV) + (0.033*2*(PF+PPU) + ((0.03*FG*9.4) + (0.2*FG*5.6))/0.6	16.65
	5 mois		17.1
	6 mois		17.4
	7 mois		17.9
	8 mois		18.5
	9 mois		19.2
	10 mois		20.2
	11 mois		21.4

<u>INRA</u> :

Y = %PV à la naissance calculé à partir de l'équation

$$Y = -1{,}99 + 13{,}67\,X - 37{,}38\,X^2 + 45{,}51\,X^3 - 18{,}32\,X^4$$

a = Composition chimique du fœtus

EB = Energie brute du fœtus (MJ/kgPV fœtus)

km= taux d'efficacité de l'énergie pour la maintenance = 0.785

kp = coefficient de production = 0.25

<u>NRC</u> :

X= Âge gestationnel depuis la conception (en jours)

PN= Poids de naissance, estimé comme étant 0.97% du poids adulte du futur poulain

PV= Poids vif de la jument (kg)

PF = poids du fœtus calculé à partir de l'équation :

$$PF = (1.10^{-7} * X^{3{,}5512}) * 0{,}01 * PN$$

PPU = poids placentaire et utérin calculé à partir de l'équation

$$PPU = \left(-0{,}0135 + (9.10^{-4} * X)\right) * PV$$

FG = Gain de poids fœtal calculé à partir de l'équation :

$$FG = (3{,}5512.10^{-7} * X^{2{,}5512}) * 0{,}01 * PN + 9.10^{-5} * PV$$

Chez l'être humain, des adaptations fonctionnelles (augmentation du nombre de récepteurs à l'insuline) et morphologiques (hypertrophie) des adipocytes sont observées durant les deux premiers trimestres de la grossesse, permettant un stockage plus important des réserves lipidiques (Baird, 1986; Hadden et McLaughlin, 2009). Ces adaptations sont associées à une augmentation des concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol et lipoprotéines (Sattar *et al.*, 1997).

Chez la jument en fin de gestation, la concentration plasmatique en cholestérol est stable (Bonelli *et al.*, 2016) et moins élevée que pour un animal non gestant (Bazzano *et al.*, 2014), ce qui doit être le résultat d'une utilisation importante du cholestérol pour la synthèse de stéroïdes (Chavatte *et al.*, 1997; Legacki *et al.*, 2016). Une augmentation en acide β-hydroxy-butyrique est aussi observée. Ce nutriment est le corps cétonique le plus abondant, produit à partir de l'oxydation partielle des acides-gras dans le foie lorsque les réserves en glucose ne permettent pas de soutenir les besoins en énergie de l'individu. Dans ce cas, les corps cétoniques sont utilisés comme source d'ATP par les cellules à la place du glucose (Fukao *et al.*, 2004). De plus, certains auteurs ont observé que la concentration en triglycérides plasmatiques augmentait jusqu'à atteindre un plateau au 7ème mois de gestation et se stabilisait en fin de gestation (Harvey *et al.*, 2005; Vincze *et al.*, 2015) malgré le fait que d'autres n'ont pas noté de variation de la triglycéridémie chez les individus gestants en fin de gestation et non gestants (Bazzano *et al.*, 2014; Mariella *et al.*, 2014). Cette observation indiquerait une lipomobilisation accrue en fin de gestation.

La forte utilisation du glucose par le fœtus conduirait donc la jument à utiliser principalement ses réserves lipidiques pour subvenir à ses besoins et aux besoins du fœtus en énergie.

1.1.3.3.1.3. Métabolisme azoté

Le métabolisme azoté s'adapte également à l'état gestant. Au cours de la gestation, les données sont controversées quant à la variation de la quantité de protéines plasmatiques (Harvey *et al.*, 1994; Suzana *et al.*, 1994; Satué *et al.*, 2010; Satué et Montesinos, 2013; Bazzano *et al.*, 2014; Mariella *et al.*, 2014; Vincze *et al.*, 2015) et à leur diminution par rapport aux individus non gestants (Bazzano *et al.*, 2014; Mariella *et al.*, 2014; Vincze *et al.*, 2015). Un résumé des différentes données de la littérature est présenté en tableau 2. Selon les études, la concentration en urée plasmatique augmente ou diminue en gestation (Harvey *et al.*, 2005; Vincze *et al.*, 2015). En fin de gestation, la concentration en urée plasmatique est plus importante chez les juments gestantes que chez les chevaux non gestants, confirmant l'augmentation de l'utilisation des acides aminés pour les processus anaboliques durant la gestation (Bazzano *et al.*, 2014; Mariella *et al.*, 2014).

La forte utilisation du glucose par le fœtus conduirait donc la jument à également utiliser ses réserves protéiques pour subvenir à ses besoins et aux besoins du fœtus en énergie.

Tableau 2. Données publiées sur la concentration en protéines plasmatiques totales chez la jument gestante et chez le cheval non gestant

Les différentes lettres pour chaque ligne correspondent aux différences statistiques ($p<0.05$) observées par les auteurs.

Auteurs	Race	Début de gestation (g/dl)	Mi-gestation (g/dl)	Fin de gestation (g/dl)	Non gestant (g/dl)	Méthode de mesure
Harvey et al (1994)	Pur-sang Anglais et Quarter Horse	/	/	6.9 ± 0.30	/	Réfractométrie
Satué et al (2013)	Pur-race espagnol	6.85 ± 0.86^{a}	7.02 ± 0.84^{a}	7.30 ± 0.60^{b}	/	Spectrophotométrie
Mariella et al (2014)	Standardbred	/	/	$6.4^{a} \pm 0.2$ $6.6^{a} \pm 0.2$	$7.0^{b} \pm 0.2$	Spectrophotométrie
Bazzano et al (2014)	Cheval de selle italien, Pur-sang Anglais et Standardbred	/	/	7.1 ± 0.2	6.9 ± 0.1	Spectrophotométrie
Milikhovic-Tur et al (2005)	Hosltein	6.74 ± 0.1	6.93 ± 0.02	6.87 ± 0.11	/	Spectrophotométrie
Satué et al (2010)	Carthujano	6.86 ± 0.04	6.87 ± 0.43	6.96 ± 0.49	/	Réfractométrie
Vincze et al (2015)	Lipizzan	7.19 ± 0.5^{a}	6.77 ± 0.1^{b}	5.82 ± 0.05^{c}	5.7 ± 0.7	Spectrophotométrie

Pour Mariella et al (2014), la première valeur de fin de gestation correspond à 20 jours avant le terme, la deuxième valeur à 10 jours avant le terme.

En conclusion, et bien que les changements de métabolisme durant la gestation ne soient pas encore bien déterminés chez la jument gestante, il existe des modifications fortes du métabolisme glucidique entre le début et la fin de gestation, associées avec des modifications du métabolisme lipidique et azoté.

1.1.3.3.2. Evolution de l'état corporel et disponibilité nutritionnelle

Le cheval est une espèce saisonnée pour laquelle la photopériode est le facteur externe le plus important influençant la période de reproduction (Sharp, 1980; Palmer et Guillaume, 1992; Nagy *et al.*, 2000). Le début de la saison de reproduction commence au printemps et se termine à la fin de l'été (Sharp, 1980; Palmer et Guillaume, 1992; Nagy *et al.*, 2000).

Le cheval en tant qu'espèce herbivore, dépend fortement du développement de la végétation pour se nourrir et a donc, à l'état sauvage, un état corporel qui évolue avec les saisons : plus élevé en été et plus faible en hiver (Kuntz *et al.*, 2006; Dawson et Hone, 2012). Ainsi, le métabolisme de la jument gestante est corrélé avec l'apport en énergie proposé : au printemps-été, au début de sa gestation, la jument peut avoir accès à une nourriture plus riche en énergie et donc faire plus de réserves. A l'automne et à l'hiver, la diminution de l'apport en énergie alimentaire conduit la jument à utiliser ses réserves pour pouvoir permettre la croissance importante du poulain en fin de gestation (Kuntz *et al.*, 2006; Dawson and Hone, 2012).

1.1.3.4. Conclusion

Les systèmes de nutrition NRC et INRA considèrent que le besoin de maintenance de la jument gestante est le même que celui d'un cheval qui n'est pas en reproduction. Au vu des différences de métabolisme, ce besoin doit être très certainement modifié. De plus, l'augmentation de la capacité de stockage en début de gestation, suivie d'une capacité plus importante à utiliser les réserves en fin de gestation démontre que le schéma classiquement proposé de nourrir la jument comme un cheval à l'entretien jusqu'au 5ème mois de gestation et d'augmenter l'apport en énergie lorsque le fœtus est le plus en demande, n'est peut-être pas le plus approprié.

Si les recommandations actuelles se rapprochent du mieux possible des besoins réels des animaux gestants, des travaux sont encore nécessaires pour mieux définir ces besoins et proposer des recommandations aux professionnels de la filière.

1.2. Pratiques d'élevage et connaissances des recommandations nutritionnelles internationales

1.2.1. Estimer l'état corporel d'un cheval

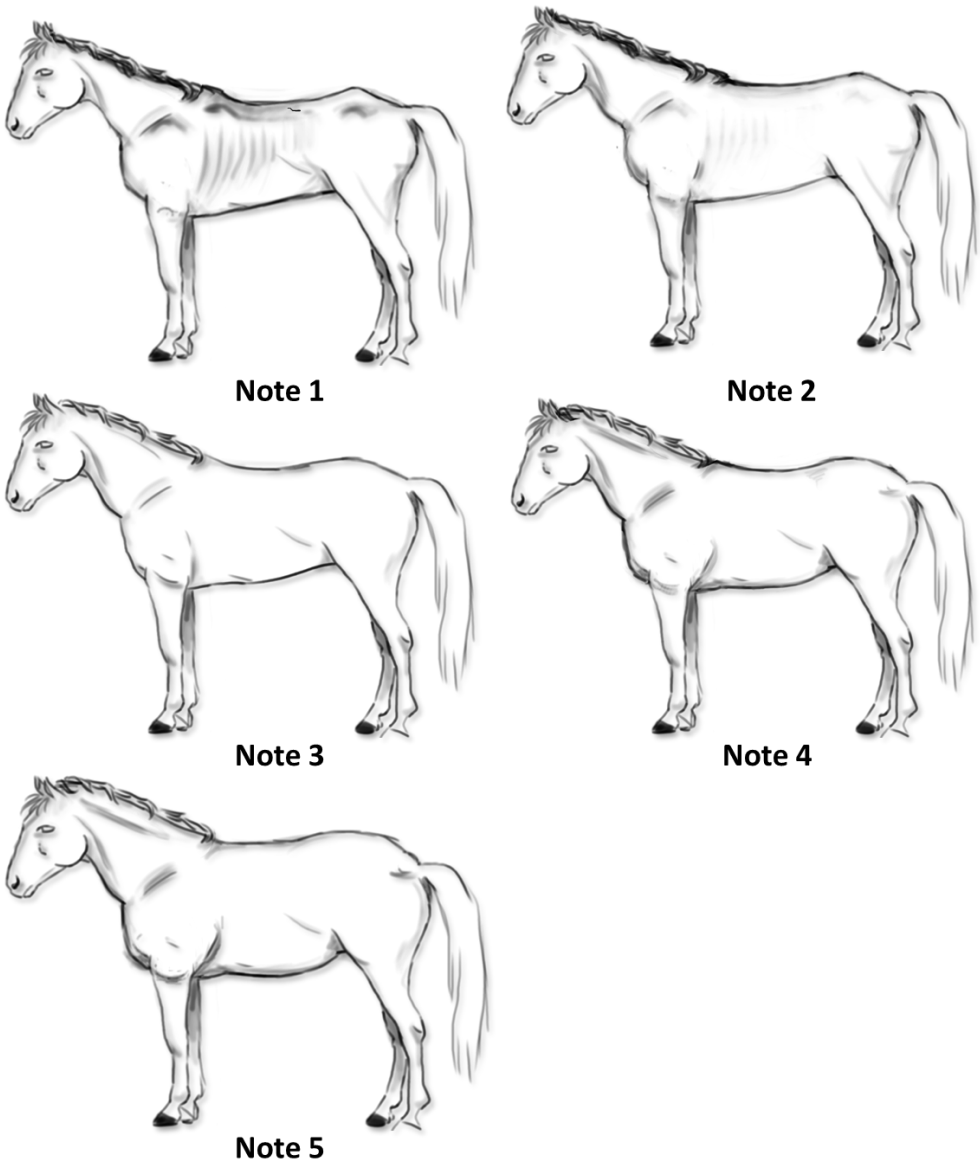


Figure A.9: Etat corporel d'après la note d'état corporelle échelle 0-5
La note 0, correspondant à un cheval cachectique, n'est pas présentée sur ce schéma. *D'après Arnaud et al., (2007).*

La pesée étant difficile à mettre en place chez les chevaux (appareillage coûteux) et non représentative de leur masse grasse, de nombreuses méthodes ont été mises en place afin d'estimer l'état corporel de ces animaux. L'utilisation de ces méthodes permet la mise en place de stratégies nutritionnelles afin d'atteindre les objectifs d'état corporel recherchés en fonction de l'état physiologique du cheval et/ou de sa discipline sportive.

Il existe à l'heure actuelle quatre méthodes pour mesurer l'état corporel d'un cheval (Tableau 3).

1.2.1.1. La note d'état corporel

1.2.1.1.1. Description de la méthode

La note d'état corporelle (NE) est à l'heure actuelle la méthode la plus facile d'utilisation car elle ne requière aucun appareillage. Cette méthode « *consiste à l'évaluation de la masse des dépôts adipeux en certains points précis […] au moyen de palpation* » (Arnaud *et al.*, 1997a). Il existe aujourd'hui deux échelles de notation de l'état corporel. Une notation basée sur une échelle de 1 à 9, surtout utilisée dans les pays anglo-saxons, développée aux Etats-Unis sur des juments Quarter Horse en fin de gestation et en lactation (Henneke *et al.*, 1983, 1984) ainsi qu'une notation basée sur une échelle de 0 à 5, mise en place en parallèle en Australie et en France sur des chevaux de selle à l'exercice de plus de 18 mois (Carrol et Huntington, 1988; Arnaud *et al.*, 1997a; Martin-Rosset *et al.*, 2008). La note la plus faible correspondant à un cheval très maigre, la note la plus élevée à un cheval obèse (Figure A.9, tableau 4).

1.2.1.1.2. Prédictibilité, reproductibilité, sensibilité de la méthode

La prédictibilité de la méthode a été validée par mesure de la quantité de gras post-mortem et par comparaison avec des mesures échographiques du tissu adipeux sous-cutané (Henneke *et al.*, 1984; Martin-Rosset *et al.*, 2008). La reproductibilité de la méthode (différence entre deux examinateurs) était relativement faible chez le Pur-sang Anglais. Les différences de mesures variaient également en fonction de la partie corporelle mesurée (Suagee *et al.*, 2008). De plus, la NE n'est pas suffisamment sensible chez le poney pour discriminer une faible perte de poids (3-4% de la masse totale) (Dugdale *et al.*, 2010). Chez le cheval, la corrélation entre l'évolution de l'épaisseur de gras sous cutané à la croupe et l'évolution de la NE est très faible, ce qui confirme sa faible sensibilité (Mottet *et al.*, 2009). De même, chez l'étalon arabe, les différences de mesure d'épaisseur de gras sous-cutané à la croupe ne sont pas observées par mesure de NE (El-Maaty *et al.*, 2014). Les deux système de NE n'ont pas été développés sur les mêmes types d'animaux (Arnaud *et al.*, 1997a; Martin-Rosset *et al.*, 2008). Des adaptations ont été réalisées sur des chevaux de selle Allemands, des Pur-Sang Anglais et des poneys (Kienzle et Schramme, 2004; Suagee *et al.*, 2008; Dugdale *et al.*, 2011). Cependant, aucune étude n'a comparé l'état corporel de chevaux très musclés et de chevaux au repos mais d'état corporel

Tableau 3. Méthodes de mesure de l'état corporel, avantages et inconvénients
D'après Geor *et al.*, 2013.

Méthode	Description	Avantages	Inconvénients
Note d'état corporel	Méthode semi-quantitative visuelle et par palpation de la mesure relative de la quantité de tissu adipeux sous-cutané basée sur une échelle de 1 à 9 ou de 1 à 5	-Facile d'utilisation et d'apprentissage, ne requière aucun outil ni appareillage -Reproductible -Prend en compte toutes les zones corporelles -Peu séparer les différentes zones corporelles	-Méthode peu sensible -Méthode subjective -Ne mesure que le tissu adipeux sous-cutané -Peut être influencé par la conformation, l'âge, la longueur du poil, la race… **-Problème de conformation pour les juments en fin de gestation**
Mensurations morphométriques	Méthodes quantitatives par mesures de différentes parties corporelles de l'adiposité relative	-Méthodes objectives -Mesures possibles pour différentes parties du corps -Méthode sensible	-Nécessitent des outils et appareillages (mètre, balance) -Ne permettent pas de distinguer l'influence de la masse grasse et de la masse maigre -Extrapolent l'état d'embonpoint à partir d'un seul dépôt adipeux
Echographie de gras sous-cutané	Méthode quantitative de mesure de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané	-Méthode objective -Méthode sensible -Les points anatomiques sont faciles à situer -Mesures possibles pour différentes parties du corps **-En sélectionnant les points anatomiques non affectés par le changement de conformation, possibilité de l'utiliser sur la jument en fin de gestation**	-Nécessite un échographe et la préparation l'animal (tonte, rasage) - Extrapole l'état d'embonpoint à partir d'un seul dépôt adipeux -Ne mesure que le tissu adipeux sous cutané
Mesure de l'eau totale	Méthodes quantitatives de la proportion de tissu maigre dans l'organisme total	-Méthodes objectives -Différencient la masse maigre de la masse grasse globale	-Méthodes lourdes ou nécessité d'appareillage (impédancemètre) -Dépendent du statut d'hydratation et de la quantité d'eau dans le système gastro-intestinal -Nécessitent d'avoir une mesure précise du poids vif -Impédancemétrie : dépend de l'endroit où sont placées les électrodes

semblable en utilisant les consignes de la grille de notation pour montrer si cette méthode permettait de distinguer les chevaux athlètes des chevaux au repos.

1.2.1.1.3. Limites de la méthode

La NE reste une évaluation subjective de l'état corporel de l'animal. Comme cette méthode est dépendante de la conformation de l'animal, ainsi que de la longueur de son poil, de son développement musculaire et de son remplissage gastro-intestinal, elle est soumise à de nombreux biais qui limitent la comparaison interindividuelle. De plus, cette méthode ayant un seuil maximum ne peut pas distinguer les différents niveaux d'obésité chez le cheval. Henneke *et al* (1983) ont remarqué que « *Des changements conformationnels se produisent chez les juments gestantes lorsqu'elles approchent de la parturition. Le poids du conceptus tire la peau et la musculature du dos, des côtes et de la base de la queue. La couverture de gras apparait diminuée dans ces zones*. » ainsi, « *pour compenser cette condition, l'accent a été placé sur le dépôt de gras derrière l'épaule et le long du garrot pour les juments près du terme*. » Les auteurs ont donc dû modifier leur notation pour évaluer l'état corporel de leurs animaux en fin de gestation. Il n'existe pas d'autres travaux sur l'utilisation de cette méthode chez la jument gestante (reproductibilité, prédictibilité, sensibilité).

1.2.1.1.4. Conclusion

Cette méthode manque de sensibilité et de reproductibilité, de plus elle est très dépendante de la conformation des animaux qui évolue beaucoup en fin de gestation. Il y a donc un besoin de trouver une méthode plus adaptée aux juments gestantes.

1.2.1.2. Les mensurations morphométriques

Les mensurations morphométriques permettent d'obtenir des mesures quantitatives objectives du volume ou de la surface d'un cheval. L'indice de masse corporel (IMC) très utilisé au sein de l'espèce humaine est difficile à mettre en place au sein de l'espèce équine. Cet indice permet de calculer la quantité de kg par surface (m^2) corporelle. Si l'IMC du cheval est calculé avec l'équation utilisée chez l'humain, il n'est corrélé qu'à 35 et 43% avec l'épaisseur de gras sous-cutané et la note d'état respectivement (Carter *et al.*, 2009a). Chez le cheval (Pur-sang Anglais et Pur-sang Arabe) et le poney (Welsh, Dartmoor et croisements), l'équation la plus corrélée avec la note d'état est le rapport périmètre thoracique / hauteur au garrot (r^2=0,64, r^2=0,83, respectivement, p<0,001) (Carter *et al.*, 2009a). Chez la jument Quarter Horse, cette équation est également corrélée à la note d'état (r^2=0.51, p<0.01) et au % de gras total mesuré par échographie de gras sous-cutané (r^2=0,44, p<0,05) (Henneke *et al.*, 1983). Ces équations ont l'avantage d'être parfaitement objectives et quantitatives mais elles ne permettent cependant pas de distinguer la proportion de poids de tissus adipeux de celle du tissu musculaire.

Tableau 4. Description des différents critères utilisée pour évaluer la note d'état sur l'échelle 0-5
D'après Arnaud *et al*., 1997, cette synthèse est celle qui est distribués aux éleveurs et professionnels de la filière.

Score	Chignon	Garrot	Arrière de l'épaule	Ligne du dos	Côtes	Croupe	Attache de queue
1	Chignon à peine apparent	Saillant, haut des omoplates visible	En creux	Apophyses épineuses marquées	Côtes très apparentes, peau collée	Contours concaves	Vertèbres et ligaments sacro-tubéraux légèrement saillants
2	Chignon visible, léger sillon à sa base	Marqué et sec	Légèrement concave, présence d'un mince dépôt adipeux	Apophyses peu couvertes mais à peine individualisables	Se devinent sous une peau souple	Point des fesses et des hanches discernables	Bien détachée, vertèbres et ligaments à peine visibles
3	Chignon bien dessiné	Ressort légèrement	Devient plat, dépôt adipeux bien délimité	Apophyses non individualisables, un léger dépôt les enrobe	A peine palpable	Peu arrondie, contour convexe	Relativement dégagée, un léger dépôt adipeux efface les reliefs des vertèbres et des ligaments
4	Chignon préhensible à la main	Noyé	Légèrement convexe, dépôt adipeux épais et mou	Apophyses recouvertes d'un dépôt adipeux faisant une « barre horizontale »	Impalpables sous le dépôt adipeux	Bien arrondie, pointes des fesses et des hanches noyées	Se détache peu, dépôt adipeux épais et mou
5	Chignon arrondi, noyé dans la masse de l'encolure, saisi d'une main largement ouverte	Noyé dans une masse graisseuse arrondie	Nettement bombé, importante masse de gras qui tremble au palper	Apophyses noyées dans le gras recouvrant les côtes	Recouvertes d'un « épais matelas » roulant sous la main	Rebondie, un « sillon » médian peu apparaître (croupe double)	Massive, noyée dans un dépôt de tissu gras formant un rond ferme « coussin »

1.2.1.3. L'échographie de gras sous-cutané

1.2.1.3.1. Description de la méthode

L'échographie de gras sous-cutané a été développée avant le système de NE et a servi de base pour le développement de la NE aux Etats-Unis (Westervelt *et al.*, 1976; Henneke *et al.*, 1983, 1984). A l'échographie, le gras apparait noir et le muscle gris (Figure A.10 A.). L'épaisseur de gras est mesurée depuis l'aponévrose jusqu'à la peau. La zone à mesurer doit être préalablement préparée (tondue et rasée). En été, de l'alcool peut être utilisé sur poils non tondus comme conducteur à la place du gel d'échographie (Figure A. 10 B).

Historiquement, le site mesuré se trouve au niveau de la croupe. C'est un site anatomique simple à localiser sur les animaux (Figure 10.B). L'intersection des muscles glutéo-biceps et semi-tendineux forme un triangle inversé par-dessus lequel la couche de tissu adipeux sous-cutané vient se poser (Figure A. 10 A et C). Il suffit ainsi de localiser le point le plus profond pour y réaliser la mesure (Figure A. 10 A et C).

1.2.1.3.2. Meilleur point de mesure

A partir de mesures sur ce point, des équations de calcul du pourcentage de tissu adipeux ont été mises en place pour les chevaux : $\%\ gras\ corporel = 4{,}70 * \big(épaisseur\ de\ gras\ (cm)\big) + 8{,}64$ (r^2=0,73) (Westervelt *et al.*, 1976). Par la suite, 5 points différents sur la croupe ont été mesurés et comparés avec la masse grasse pesée en post-mortem. Le meilleur point de mesure était celui utilisé par Westervelt *et al* (1976), à la croupe (r^2 = 0,96) (Kane *et al.*, 1987). L'équation alors proposée est $\%\ gras\ corporel = 5{,}47 * \big(épaisseur\ de\ gras\ (cm)\big) + 2{,}47$. Une étude réalisée en 2004 comparant 4 points de mesure échographique avec la NE a validé la corrélation importante entre le point de mesure à l'intersection des muscles glutéo-biceps et semi-tendineux (Gentry *et al.*, 2004).

1.2.1.3.3. Limites de la méthode

Bien que cette méthode soit plus sensible que la NE, ces équations ont été développées sur un nombre faible d'animaux (n=8 et 6, respectivement) et de plus, ne peuvent pas prendre en compte la différence de zone d'accrétion du tissu adipeux entre les races, voire les états physiologiques (Geor, 2008; Suagee *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 2009a; Giles *et al.*, 2013; Sanchez *et al.*, 2016).

La NE ne corrèle pas toujours très bien avec la mesure de gras sous-cutané. Cela peut être lié à la plus grande sensibilité de l'échographie ou encore au fait que la NE est une méthode de mesure globale tandis que la mesure échographique ne se fait qu'à un point précis de l'animal.

Pour pouvoir prendre en compte la NE et la mesure d'épaisseur de gras sous-cutané, Superchi et al (2014) ont proposé l'utilisation d'un indice : (Mesure échographique x NE)/(Mesure échographique + NE) car ils observaient de mauvaises corrélations entre les deux mesures (Superchi *et al.*, 2014).

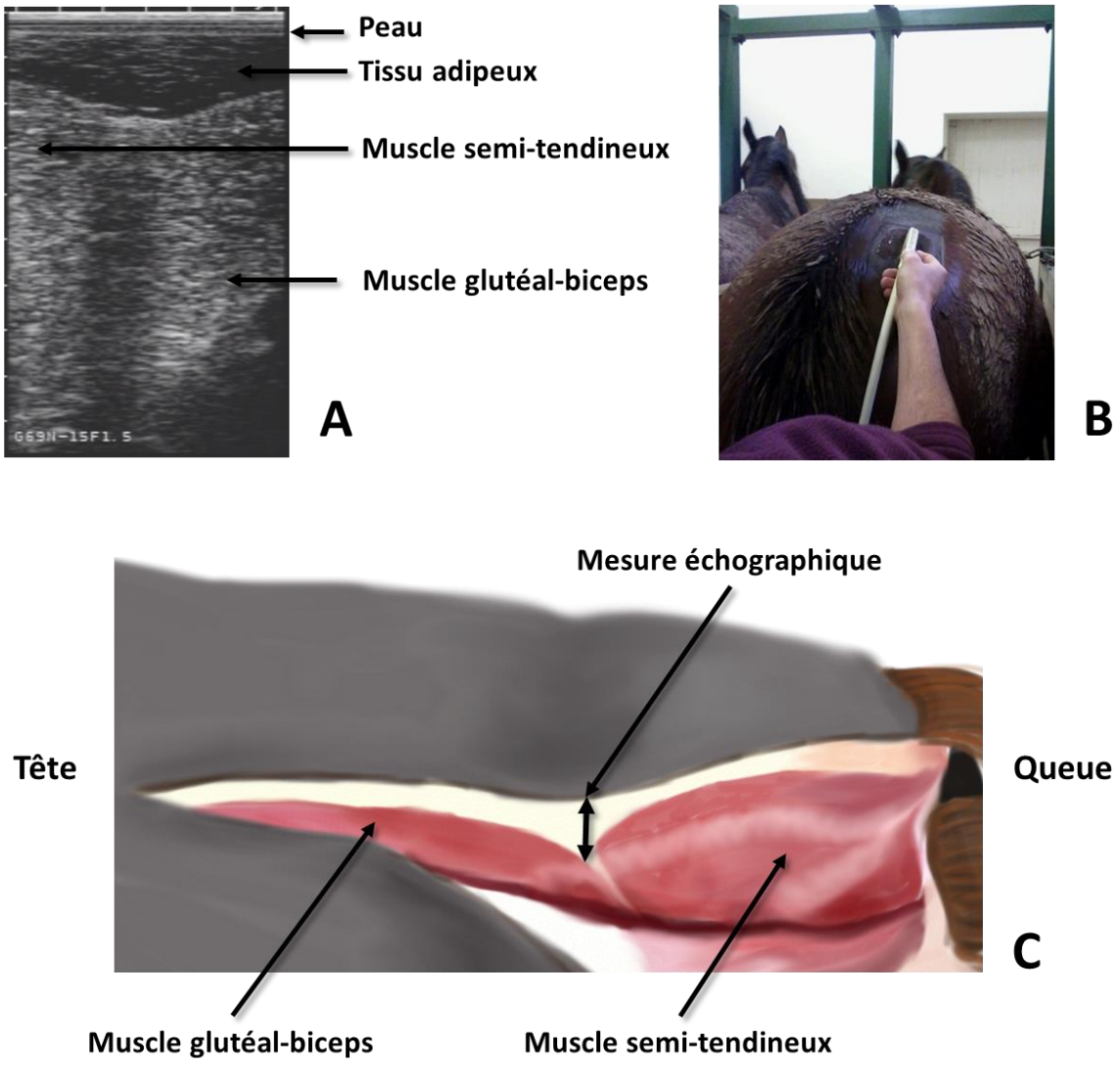


Figure A.10: Echographie de l'épaisseur de gras sous-cutané au niveau de la croupe
A. Image obtenue par échographie entre les muscles semi-tendineux et glutéal-biceps. Le tissu adipeux est en noir, le muscle, en gris. B. Position de la sonde sur la croupe préalablement préparée. C. Représentation schématique de la zone anatomique échographiée, *d'après Hervouet, (2012).*

1.2.1.3.4. Conclusion

Malgré le fait que la mesure échographique ne se fasse qu'à un point précis de l'animal, en raison de sa grande sensibilité, de sa répétabilité et parce qu'elle offre la possibilité de réaliser la mesure sur un point non affecté par les changements de conformation liés à la gestation, cette méthode parait être la plus adaptable au suivi de l'évolution de l'état corporel en gestation. La validation de cette méthode n'a pas encore été faite chez la jument gestante et il reste à définir quelle zone anatomique est la plus adaptée pour ce stade physiologique.

1.2.1.4. La quantification de la quantité d'eau corporelle totale

La quantification de la quantité d'eau corporelle totale rassemble plusieurs méthodes parmi lesquelles le dosage de l'oxyde de deutérium (eau lourde) et la mesure de l'impédance bioélectrique. La technique dite « eau lourde » est difficile à mettre en place et n'est plus beaucoup utilisée à l'heure actuelle. Ce paragraphe traitera donc de l'impédance bioélectrique.

L'impédance bioélectrique est une méthode bien maîtrisée et couramment utilisée en médecine humaine. Cette méthode repose sur la mesure d'un flux électrique (courant alternatif) traversant un compartiment liquide entre deux électrodes. Un signal électrique pourra traverser un compartiment riche en eau et en électrolytes tandis qu'il aura du mal à traverser un compartiment riche en graisse. Cela permet ainsi de calculer le pourcentage de masse maigre dans les compartiments analysés, voire dans le corps entier puis par simple retrait, le pourcentage de masse grasse dans ces mêmes compartiments. C'est une méthode qui repose sur une technologie ne prenant pas de place, portative, non invasive et facile à utiliser (De Lorenzo *et al.*, 1997). Il a été montré que cette méthode était prédictive et sensible chez le cheval (Forro *et al.*, 2000; Latman *et al.*, 2011). Cependant, le système digestif du cheval (surtout au niveau du colon et du caecum) contient un volume important et variable d'eau (Andrews *et al.*, 1997), ce qui peut entrainer une perte de précision et une surestimation du volume total d'eau corporelle et donc une surestimation du pourcentage de masse maigre, de même que pour les techniques lourdes (Kearns *et al.*, 2002a).

Il existe très peu d'articles sur l'utilisation de l'impédance bioélectrique chez les chevaux, si ceux présentés ci-dessus indiquent une bonne corrélation entre la mesure de volume total d'eau corporelle par les méthodes classiques et l'impédance, il n'existe visiblement aucun article traitant de l'impédance bioélectrique dans le cas de la jument gestante (mise en place de la technique, validation et mise en place de modèles).

1.2.2. Connaissances pratiques des détenteurs d'équidés sur la mesure de l'état corporel et la ration

Les propriétaires ou détenteurs de chevaux au travail nourrissent leurs chevaux par essai et erreur et de manière empirique, basée sur des traditions plutôt que sur des résultats scientifiques (Southwood *et al.*, 1993a, b).

Deux enquêtes réalisées auprès de propriétaires et détenteurs de chevaux montrent que ces derniers ne pèsent pas régulièrement leurs animaux et qu'une forte proportion d'entre eux pèsent les chevaux « à l'œil » (Hoffman *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2015). De plus, beaucoup ne mesurent pas la note d'état de leurs animaux (Murray *et al.*, 2015). Entre 87% et 96% des personnes interrogées complémentent leurs chevaux avec des concentrés (Hoffman *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2015). Les quantités de concentrés distribués sont mesurées grossièrement et principalement en volume, en utilisant des pelles à nourriture (Hoffman *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2015). De plus, la composition des régimes et les quantités distribuées sont décidés en majorité par les propriétaires ou les détenteurs (Honoré et Uhlinger, 1994; Hoffman *et al.*, 2009; Harris, 2010; Murray *et al.*, 2015). Or, lorsqu'ils sont interrogés, la majorité des propriétaires et détenteurs de chevaux ne sont pas capables de répondre correctement à un questionnaire simple sur l'alimentation des chevaux. En effet, 69% des personnes interrogées manquent de connaissances concernant la bonne utilisation des concentrés dans un régime (Hoffman *et al.*, 2009). De plus, les propriétaires de chevaux de loisir et compétition amateur nourrissent avec des rations déséquilibrées et surtout trop riches en énergie par rapport aux recommandations internationales (Honoré et Uhlinger, 1994). La qualité et la quantité des rations varient pour les chevaux de course ou de sport en compétition internationale, pour lesquels la nutrition et l'état corporel expliquent une part importante des performances (Gallagher *et al.*, 1992; Southwood *et al.*, 1993a; Sommaire, 2007; Martin *et al.*, 2008; Verhaar *et al.*, 2014). Ces rations sont distribuées en fonction des besoins spécifiques des chevaux (race et discipline) pour optimiser la performance sportive. Les entraineurs et cavaliers de chevaux athlètes suivent donc de manière plus régulière le poids et l'état corporel de leurs animaux (communication personnelle).

Ces études ne prennent pas en compte la catégorie professionnelle ou amateur des répondants. Cependant, les études réalisées sur les entraineurs en course montrent que ces derniers nourrissent en suivant des traditions et que l'expérience ne modifie pas cet état de fait (Southwood *et al.*, 1993a, b; Richards *et al.*, 2006).

1.2.3. Constat des pratiques nutritionnelles Européennes

Les données concernant les pratiques nutritionnelles en élevage sont extrêmement rares en France et à l'étranger.

Les éleveurs de chevaux qui seront par la suite valorisés pour le sport et/ou la course nourrissent en général leurs juments gestantes avec des concentrés (Vander Heyden *et al.*, 2012; Jouven *et al.*, 2013).

De plus, une grande proportion de ces éleveurs nourrissent leurs juments avec des rations trop riches en énergie par rapport aux recommandations scientifiques (entre 110 et 140% en fonction de la race, du système de référence et de la région d'élevage) (Valette *et al.*, 2004; Winkelsett *et al.*, 2006).
Les éleveurs de chevaux de race Camargue (race locale robuste élevée sur de grands parcours et utilisée pour le travail ou le loisir) quant à eux ne supplémentent pas ou peu (seul 8% des élevages) les juments en gestation avec des concentrés (Jouven *et al.*, 2013).

Le fait que les éleveurs nourrissent plus que les recommandations allemandes et françaises en fin de gestation pourrait être expliqué en partie par :

- Comme pour les entraineurs : des connaissances empiriques et traditionnelles.
- Une méconnaissance des recommandations.
- Une inadéquation entre les recommandations et les objectifs d'élevage (les animaux perdent de l'état ou gagnent trop d'état par rapport aux recommandations). Par exemple, les chevaux de course français de 3 ans reçoivent entre 8 et 33% trop d'énergie en fonction de la catégorie de référence utilisée (cheval de 2 ans en exercice très intense, cheval adulte en exercice très intense, cheval de 3 ans en exercice modéré) mais maintiennent un état corporel optimal pour leur activité (Sommaire, 2007).

En résumé

Il existe plusieurs systèmes de calculs de besoins et de recommandations nutritionnelles chez l'équin. Ces systèmes sont basés sur des niveaux d'énergie différents et il n'est donc pas possible de traduire un système à un autre. De plus, les recommandations pour les juments en gestation sont encore peu adaptées et toujours en évolution. La prise en compte des changements métaboliques au cours de la gestation pourrait permettre une meilleure compréhension des besoins nutritionnels des poulinières.

Les recommandations nutritionnelles sont peu ou mal suivies par les détenteurs de chevaux :

- Les juments gestantes sont nourries le plus souvent avec des concentrés et les cas de surnutrition ne sont pas rares
- L'état corporel des chevaux est rarement suivi, d'autant plus qu'il est difficile à estimer chez la jument en fin de gestation

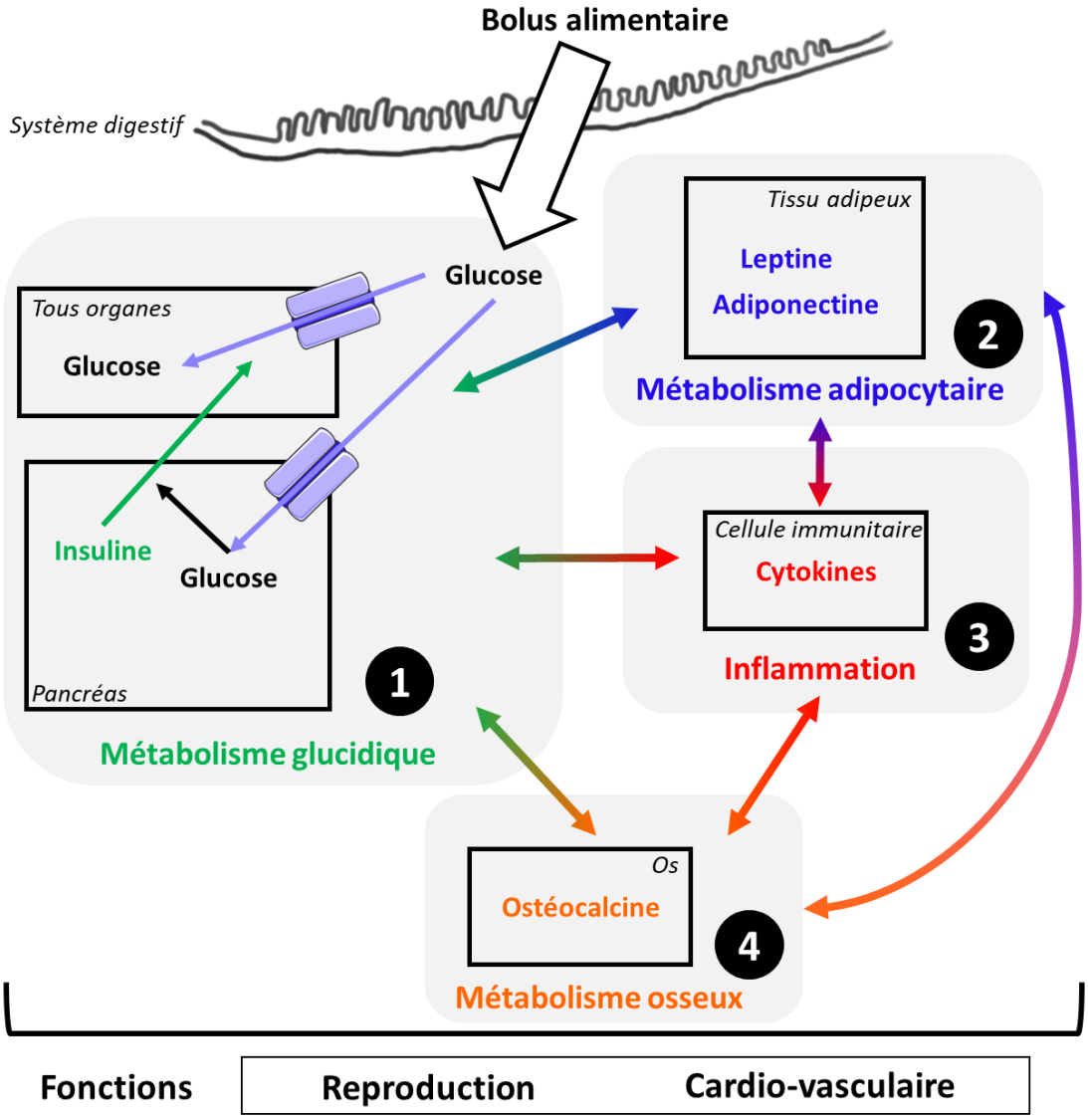


Figure A.11. Schéma récapitulatif de l'organisation des différents paragraphes du chapitre « Métabolisme énergétique et ses relations avec les autres fonctions »

Les paragraphes du chapitre présent sont organisés:

-1. **Métabolisme glucidique** : L'entrée du glucose dans les cellules se réalise via des transporteurs dédiés. Ces transporteurs peuvent être indépendants ou dépendants de l'insuline. L'entrée du glucose, mais également d'autres facteurs nutritionnels et hormonaux, dans les cellules β-pancréatiques va stimuler la synthèse d'insuline qui elle-même va avoir une action sur la translocation des transporteurs sensibles à l'insuline dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie principalement. L'insuline régule également le métabolisme adipocytaire, l'inflammation systémique, le métabolisme osseux ainsi que les fonctions de reproduction et cardio-vasculaire.

-2. **Métabolisme adipocytaire**. Les adipocytes sécrètent, sous l'influence de facteurs hormonaux notamment, des adipokines (leptine et adiponectine) qui ont la capacité de réguler l'appétit, le métabolisme glucidique, l'inflammation, le métabolisme osseux ainsi que les fonctions de reproduction et cardio-vasculaire.

-3. **Inflammation systémique**. Les cytokines sécrétées par les cellules immunitaires et le tissu adipeux ont également la capacité de réguler le métabolisme glucidique ainsi que le métabolisme osseux.

-4. **Métabolisme osseux**. Le remodelage osseux est soumis à l'influence de nombreux facteurs nutritionnels et hormonaux. Les cellules osseuses synthétisent lors de ce remodelage une hormone, l'ostéocalcine, qui a également des capacités de régulation du métabolisme glucidique et de la fonction de reproduction.

2. Métabolisme énergétique et ses relations avec les autres fonctions

La régulation du métabolisme énergétique implique de nombreux organes, dont les principaux sont : la **thyroïde**, le **système digestif**, le **pancréas**, le **foie**, les **muscles squelettiques**, le **tissu adipeux**, les **reins**, le **cerveau**, les **cellules immunitaires**, les **gonades** ainsi que l'**os** et le **cartilage**. Ces organes communiquent entre eux *via* la synthèse d'hormones produites, entre autres, par l'**axe hypothalamo-hypophysaire** (hormone de croissance (GH), thyréostimuline (TSH) et hormone lutéinisante (LH)), la **thyroïde** (triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4)), le **système digestif** (incrétines : glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et peptide insulinotrope dépendant du glucose (GIP)), le **pancréas** (insuline et glucagon), le **foie** (Insulin like growth factor 1 (IGF-1), protéines de l'inflammation), le **tissu adipeux** (adipokines : leptine et adiponectine), les **cellules immunitaires** (cytokines : facteur de nécrose tumorale (TNF-α), interleukines (IL)), les **gonades** (œstrogènes, testostérone) ou encore le **tissu osseux** (ostéocalcine). Ces hormones ont la capacité de réguler chacune plusieurs fonctions, si bien que la régulation du métabolisme énergétique (homéostasie glucidique par exemple) est intrinsèquement liée aux fonctions immunitaires, cardiovasculaires, de croissance, et développement osseux ou bien encore de reproduction.

La Figure A.11 schématise les interactions principales prises en compte dans cette thèse. Chacun de ces aspects est présenté dans les différentes parties de ce chapitre.

2.1. Métabolisme glucidique

L'homéostasie glucidique est extrêmement bien régulée dans un organisme sain. L'entrée du glucose dans les cellules est principalement régulée par l'insuline (Figure A.12). La régulation de l'homéostasie glucidique peut être perturbée suivant les états physiologiques, durant la gestation et la lactation ou bien encore après un exercice intense.

2.1.1. Les transporteurs du glucose (GLUT)

L'entrée du glucose dans les différents tissus est réalisée *via* des transporteurs de glucose (famille des GLUT (protéines) ou Solute Carrier Family 2 (*SLC2*, gène)) par diffusion facilitée (Tableau 5). Parmi ces transporteurs, certains sont indépendants de l'insuline (GLUT1, GLUT2, GLUT3) tandis que GLUT4 est dépendant de l'insuline (Saltiel et Kahn, 2001). Les récepteurs GLUT8 et GLUT12 pourraient également être dépendants de l'insuline (Lacombe, 2014). Il existerait 14 GLUT chez l'homme (Mueckler et

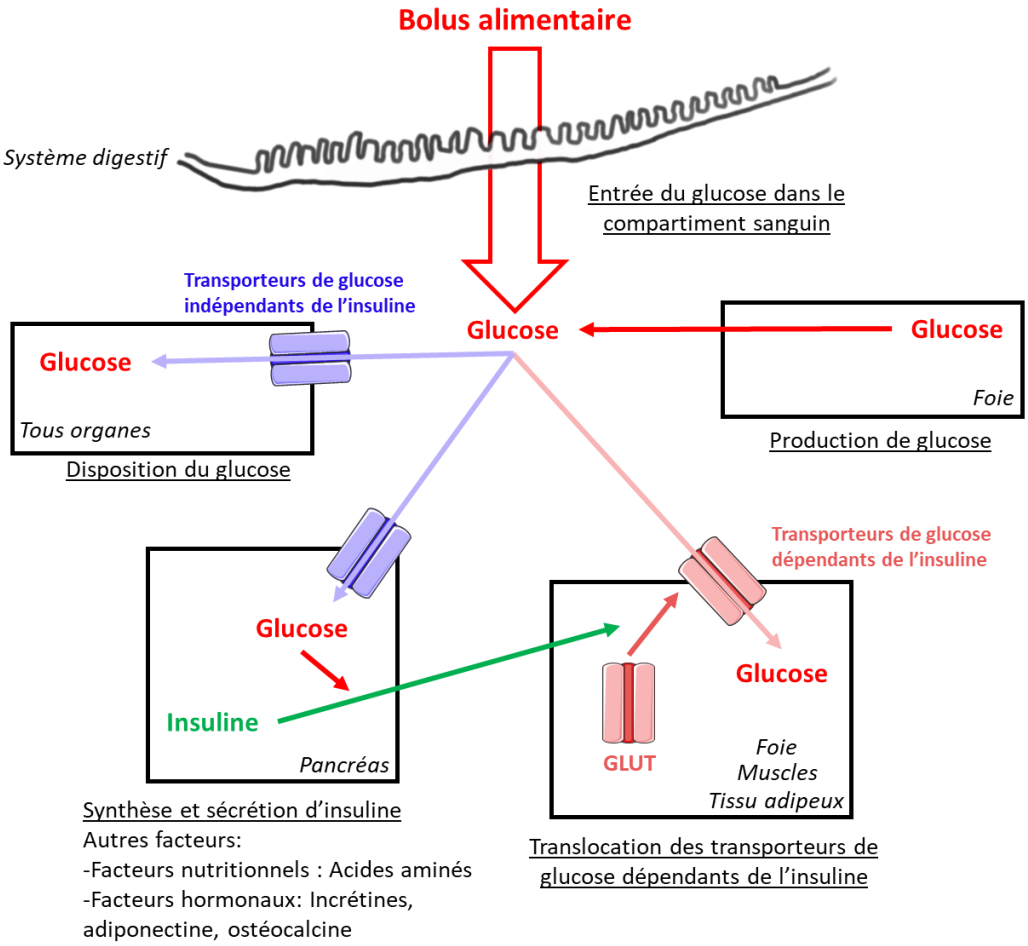


Figure A.12. Entrée du glucose dans les cellules et stimulation de la synthèse d'insuline

- Une fois dans le compartiment sanguin le glucose pénètre dans les cellules via des transporteurs de glucose (GLUT) indépendants de l'insuline.
- Dans les cellules β-pancréatiques, le glucose stimule la synthèse et la sécrétion d'insuline. D'autres facteurs nutritionnels et hormonaux ont également cette capacité.
- L'insuline va alors stimuler la translocation des transporteurs dépendants de l'insuline à la membrane des cellules exprimant le récepteur à l'insuline (foie, muscles squelettiques et tissu adipeux) ainsi que l'anabolisme, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Thorens, 2013). Ici ne sont présentés que les transporteurs les plus importants et les mieux décrits chez le cheval.

2.1.1.1. Transporteurs indépendants de l'insuline

Le transporteur **GLUT1** est considéré comme ubiquitaire puisque présent en majorité sur la membrane des érythrocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales des astrocytes et du cerveau, du placenta et des tissus fœtaux. Il est moins exprimé mais cependant présent au niveau du muscle squelettique, du tissu adipeux et du foie chez de nombreuses espèces, parmi lesquelles le cheval (Olson et Pessin, 1996; Wooding *et al.*, 2000; Annandale *et al.*, 2004; Suagee *et al.*, 2011; Mueckler et Thorens, 2013; Stout *et al.*, 2015). Chez le cheval, GLUT1 est également exprimé au niveau des chondrocytes (Phillips *et al.*, 2005; Peansukmanee *et al.*, 2009) et des lamelles kéraphylleuses du sabot (Asplin *et al.*, 2011) et du cœur (de Laat *et al.*, 2015). Chez l'homme, l'expression de *SLC2A1*, codant pour GLUT1, a également été observée dans les cellules β-pancréatiques (McCulloch *et al.*, 2011).

Le transporteur **GLUT2** est majoritairement présent sur la membrane des hépatocytes mais également sur la membrane des cellules β du pancréas, sur la membrane des entérocytes, sur la membrane des cellules du tubule proximal des reins, les neurones et les astrocytes de nombreuses espèces parmi lesquelles le cheval (Olson et Pessin, 1996; Taylor *et al.*, 2012; Mueckler et Thorens, 2013; Thorens, 2014). L'expression de *SLC2A2*, qui code pour GLUT2, a également été montrée chez le cheval au niveau du trophectoderme (Stout *et al.*, 2015) et du muscle squelettique (Barrey *et al.*, 2009, 2011).

Le transporteur **GLUT3** est exprimé à la surface des neurones (Mueckler et Thorens, 2013) ainsi que des cellules des muscles squelettiques (Stuart *et al.*, 2001) et dans le testicule (Lacombe, 2014). Chez le cheval, l'expression de *SLC2A3*, codant pour GLUT3, a été également observée au niveau des muscles squelettiques (Eivers *et al.*, 2010). Ce transporteur est également exprimé au niveau des chondrocytes (Phillips *et al.*, 2005) et du placenta (utérus et chorion) (Wooding *et al.*, 2000; Stout *et al.*, 2015) chez le cheval.

2.1.1.2. Transporteurs dépendants de l'insuline

Le transporteur **GLUT4** est majoritairement exprimé dans le muscle squelettique et cardiaque et le tissu adipeux chez de nombreuses espèces ainsi que chez le cheval (Saltiel et Kahn, 2001; Nout *et al.*, 2003; van Dam *et al.*, 2004; Jose-Cunilleras *et al.*, 2005; Mueckler et Thorens, 2013; Lacombe, 2014), mais également beaucoup plus faiblement au niveau des lamelles kéraphylleuses du sabot (Asplin *et al.*, 2011; de Laat *et al.*, 2015). Il a été montré chez le cheval de sport Hollandais que GLUT4 est principalement exprimé dans le cytosol des fibres musculaires rapides de type IIB et qu'il serait donc exprimé d'une manière fibre-spécifique dans le muscle (van Dam *et al.*, 2004). Ce récepteur étant sensible à l'insuline, son activation sera présentée en **partie 2.1.3**. Le transporteur *SLC2A8*, codant

Tableau 5. Présentation des principaux transporteurs de glucose et de leur localisation tissulaire

Nom de gène	Nom de protéine	Substrats	Dépendant de l'insuline	Tissu	Source
SLC2A1	GLUT1	Glucose, mannose, galactose, glucosamine, ascorbate réduit	Non	Erythrocytes, fibroblastes, cerveau (cellules endothéliales, astrocytes), cœur, placenta, fœtus, muscle squelettique, tissu adipeux, foie, chondrocytes, sabot, endomètre, pancréas	Annandale *et al.*, (2004) ; Asplin *et al.*, (2011) ; De Ruijter Villani *et al.*, (2015) ; De Laat *et al.*, (2015) McCulloch *et al.*, 2011 ; Mueckler et Thorens (2013) ; Olson et Pessin (1996) ; Peansukmanee *et al.*, (2009) ; Phillips *et al.*, (2005) Suagee *et al.*, (2011) ;
SLC2A2	GLUT2	Glucose, galactose, fructose, mannose, glucosamine	Non	Foie, intestin, reins, pancréas, cerveau (neurones et astrocytes), muscle squelettique, trophectoderme	Barrey *et al.*, (2009, 2011) Mueckler et Thorens, (2013) ; Olson et Pession, (1996) ; Taylor et al., (2012) ; Thorens, (2014) ; Stout *et al.*, 2015
SLC2A3	GLUT3	Glucose, galactose, mannose, xylose	Non	Neurones, chondrocytes, muscles, placenta (utérus et chorion), testicule	De Ruijter Villani *et al.*, (2015) ; Eivers *et al.*, (2010) ; Lacombe, (2014) ; Mueckler et Thorens, (2013) ; Phillips *et al.*, (2005) ; Stuart *et al.*, (2001) ; Wooding *et al.*, (2000)
SLC2A4	GLUT4	Glucose, glucosamine	Oui	Muscles squelettiques (fibre spécifique) et cardiaques et tissus adipeux (blanc et brun), sabot	Asplin *et al.*, (2011) ; De Laat et al., (2015) ; Lacombe, (2014) ; Mueckler et Thorens, 2013
SLC2A8	GLUT8	Glucose, fructose, galactose	?	Testicule, cerebellum, grlande surrénale, foie, rate, tissu adipeux brun, poumon, blastocyste, sabot	De Laat *et al.,* (2015) Mueckler et Thorens, 2013
SLC2A12	GLUT12	Glucose	?	Muscle squelettique, cœur, tissu adipeux, sabot, prostate, glande mammaire	De Laat *et al.*, (2015) Waller *et al.*, (2011) ; Waller *et al.*, (2013)

pour **GLUT8** est exprimé dans le testicule, le cervelet, la glande surrénale, le foie, la rate, le tissu adipeux brun et le poumon chez l'homme, la souris et/ou le cheval (Mueckler et Thorens, 2013; Lacombe, 2014). GLUT8 est également exprimé au niveau des lamelles kéraphylleuses du sabot chez le cheval (de Laat *et al.*, 2015)**.**

Le transporteur **GLUT12** est exprimé par les muscles squelettiques, le tissu adipeux et les lamelles kéraphylleuses du sabot chez le cheval (Waller *et al.*, 2011a, b; de Laat *et al.*, 2015). Ce est également exprimé par les cellules du myocarde, de la prostate et de la glande mammaire chez l'homme, les rongeurs et les bovins (Waller *et al.*, 2013; Lacombe, 2014). Cependant, malgré son expression dans les tissus sensibles à l'insuline, sa présence membranaire dans les cellules musculaire ou adipeuses ne varie pas selon que les chevaux soient sensibles ou résistants à l'insuline et n'est pas augmentée en cas de stimulation par l'insuline (Waller *et al.*, 2011a, b), contrairement à ce qui est observé dans des études réalisées *in vitro* chez l'homme (Stuart *et al.*, 2009). La dépendance de GLUT12 à l'insuline et sa localisation intra-cytoplasmique sont donc encore une hypothèse. Dans le cas d'une hyperinsulinémie prolongée (afin de modéliser une fourbure), la quantité de transporteurs GLUT8 et GLUT12 augmente au niveau des lamelles kéraphylleuses du sabot sans modification de GLUT1 et GLUT4 (de Laat *et al.*, 2015).

L'entrée du glucose dans les cellules est donc réalisée grâce à ces différents transporteurs pour lesquels la régulation de l'expression peut avoir des effets importants sur la régulation de l'homéostasie glucidique et l'apparition de pathologies à long terme.

2.1.2. Production d'insuline par le pancréas

2.1.2.1. Description de la protéine

L'insuline est une hormone pleiotrope ayant une action au niveau cellulaire, tissulaire et systémique. « *Elle est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas et maintient une concentration normale de glucose en facilitant la prise de glucose par les cellules, régulant le métabolisme des glucides, lipides et protéines et promouvant la division et la croissance cellulaire par ses effets mitogéniques* » (Wilcox, 2005).

L'insuline est un dipeptide contenant deux chaînes (A et B) liées par deux ponts disulfures de 51 acides aminés. La chaîne A possède 21 acides aminés et la chaîne B 30 acides aminés (Wilcox, 2005; Fu *et al.*, 2013).

2.1.2.2. Synthèse et dégradation de l'insuline

Tableau 6. Résumé des différents facteurs qui influent sur la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans

Stimulus	Catégorie	Facteur	Commentaire
Stimule	Nutriment	Glucose	***Observé chez le cheval***
		Acides aminés	*Seul ou en synergie avec le glucose –* ***Arginine et leucine observé chez le cheval***
		AGNE	*En cas d'augmentation aigue de la concentration en AGNE*
		Acides gras à longue chaine	*En synergie avec une concentration élevée de glucose*
		Acides gras ?	
	Hormone	Œstrogènes	*17-β-œstradiol*
		Incrétines	*Potentialisent l'effet du glucose*
		Adiponectine	
Inhibe	Nutriment	AGNE	*En cas de concentration élevée en AGNE chronique*
		Acides gras ?	*Palmitate, oléate et acides gras polyinsaturés*
	Hormone	Leptine	***Indices chez le cheval***
		Somatostatine	*Action paracrine –* ***Observé chez le cheval***

L'insuline est synthétisée dans les cellules β des îlots de Langerhans dans le réticulum endoplasmique en tant que pré-pro-insuline (110 acides aminés) (Wilcox, 2005; Fu *et al.*, 2013). La pré-pro-insuline est formée d'un peptide signal en position N-terminale, de la chaîne B et de la chaîne A (qui contient alors 100 acides aminés) connectés par le peptide-C (Wilcox, 2005; Fu *et al.*, 2013). Le retrait du peptide signal permet à la molécule d'acquérir 3 ponts disulfures et sa forme en 3 dimensions et de devenir la pro-insuline (Patzelt *et al.*, 1978; Huang et Arvan, 1995). La pro-insuline est ensuite transférée dans l'appareil de Golgi *via* des vésicules sécrétoires où la pro-insuline va être clivée en insuline et peptide-C (Wilcox, 2005; Fu *et al.*, 2013). L'insuline et le peptide-C sont sécrétés en quantité équimolaire dans la veine porte hépatique (Horwitz *et al.*, 1975).

Le foie est l'organe principal du catabolisme de l'insuline, dégradant près de 2/3 de l'insuline circulant dans la veine porte (Wilcox, 2005).

2.1.2.3. Facteurs nutritionnels, hormonaux et neuronaux stimulant la sécrétion d'insuline

La synthèse de l'insuline est régulée par un grand nombre de facteurs (Tableau 6, Figure A.13) mais le glucose est le stimulus principal et le premier à être apparu au cours de l'évolution (Fu *et al.*, 2013). L'ingestion de glucose entraine une sécrétion d'insuline plus importante que l'ingestion de protéines chez l'homme (Nuttall *et al.*, 1984) mais également chez le cheval lorsque le glucose est ingéré sous forme de concentrés et que les protéines sont fournies sous forme de tourteau de coprah (Richards et Kempton, 2016). Les lipides ont également une action sur la sécrétion d'insuline. Les travaux les concernant n'ont cependant pas été entrepris dans l'espèce équine. Un grand nombre d'hormones parmi lesquelles les œstrogènes, les incrétines, la leptine, l'adiponectine, la somatostatine et l'ostéocalcine ont également des effets sur la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans. Le système nerveux influence également la sécrétion d'insuline mais cet aspect ne sera pas présenté ici (Wilcox, 2005).

2.1.2.3.1. Glucose

Chez les rongeurs, le transporteur de glucose prédominant dans le pancréas est GLUT2 alors que GLUT1 et GLUT3 sont prédominants dans le pancréas humain (De Vos *et al.*, 1995; McCulloch *et al.*, 2011). Chez le cheval, le (ou les) transporteur(s) de glucose principal(aux) n'a(ont) pas encore été déterminé(s) (de Graaf-Roelfsema, 2014).

Dans les cellules β, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (Figure A.13). La glucokinase est considérée comme un « senseur » du glucose car elle a une faible affinité pour le glucose par rapport aux autres hexokinases : elle fonctionne ainsi à son maximum de vitesse

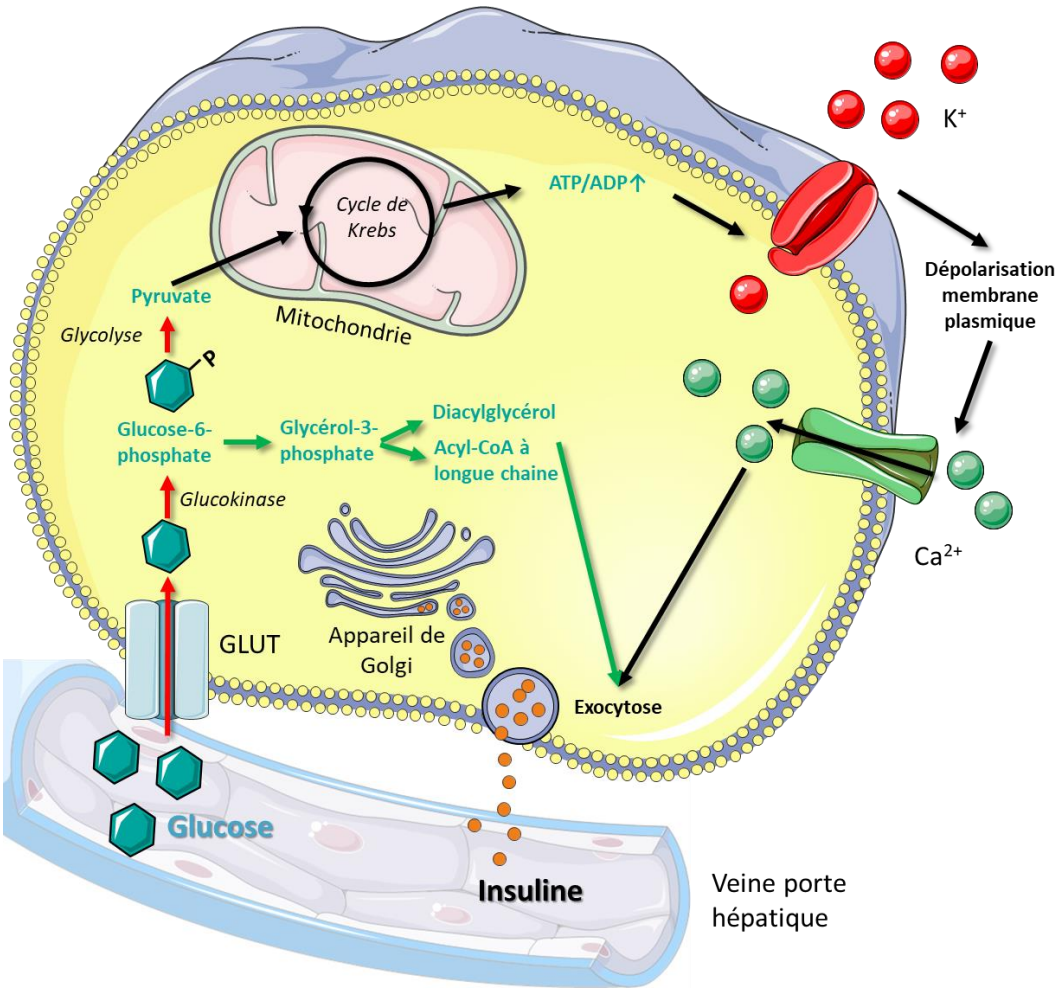


Figure A.13. Schéma récapitulatif des mécanismes conduisant à la sécrétion d'insuline par les cellules β-pancréatiques par stimulation du glucose

Il existe trois voies principales :

- Flèches rouges: Le glucose pénètre dans la cellule grâce aux transporteurs GLUT indépendants de l'insuline. Il est phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase. Cette enzyme est le facteur limitant de la libération d'insuline car elle a une affinité faible avec le glucose et n'est pas inhibée par le glucose-6-phosphate.
- Flèches noires: Le glucose-6-phosphate entre ensuite dans les voies de dégradation que sont la glycolyse et cycle de Krebs pour former de l'ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP entraine la fermeture des canaux potassiques ATP sensibles et donc une dépolarisation de la membrane plasmique, ouvrant les canaux calciques voltage dépendants. L'influx de calcium va alors activer l'exocytose des granules contenant l'insuline.
- Flèches vertes: Le glucose-6-phosphate peut également être métabolisé en, glycérol-3-phosphate qui est un métaboliste important pour générer les facteurs couplés au métabolisme lipidique tels que les acyl-coA à longue chaine ou le diacylglycérol qui augmentent également la sécrétion de l'insuline.

D'après De Graaf-Roselma et al., (2014) ; Fu et al., (2013) et Wilcox, (2005).

lorsque les concentrations en glucose sont très élevées (Fu *et al.*, 2013). Le G6P entre ensuite dans les voies de glycolyse et du cycle de Krebs pour former de l'ATP. Cette formation d'ATP inhibe les canaux potassiques ATP-sensibles, dépolarisant la membrane plasmique et ouvrant les canaux calciques dépendants du voltage. Cet influx de calcium dans la cellule cause l'exocytose des granules contenant l'insuline (Wilcox, 2005; Fu *et al.*, 2013; Rorsman et Braun, 2013; de Graaf-Roelfsema, 2014). Le glucose-6-phosphate peut également être métabolisé en glycérol-3-phosphate. Le glycérol-3-phosphate est un métabolite important pour générer les facteurs couplés au métabolisme lipidique tels que l'acyl-coA ou le diacylglycérol qui augmentent également la sécrétion de l'insuline. Cette voie alternative est indépendante du métabolisme de la mitochondrie (Fu *et al.*, 2013).

Ces mécanismes conduisent, chez le cheval, à une relation linéaire entre la dose injectée par voie intraveineuse et la réponse insulinémique observée (Toth *et al.*, 2009).

Chez l'homme, la sécrétion d'insuline se réalise en deux étapes : un pic d'insuline précoce suivi par un pic plus tardif et plus long (Henquin *et al.*, 2002). Cela est lié au fait qu'une partie des vésicules d'insuline est stockée à la surface de la membrane plasmique (« pool facilement utilisable ») et est donc très rapidement libérable dans la circulation (Overgaard *et al.*, 2005). Les autres vésicules qui se déplacent librement dans le cytoplasme vont par la suite se diriger vers le « pool facilement utilisable ». La sécrétion de ces vésicules correspond au deuxième pic. La 1ère phase induit principalement une inhibition de la production de glucose hépatique tandis que la seconde phase augmente l'utilisation du glucose par les tissus périphériques (Cherrington *et al.*, 2002). Chez le cheval, l'apparition de ces deux phases n'est pas aussi évidente (de Graaf-Roelfsema, 2014). La première phase se déroule 1 à 2 minutes après l'injection intraveineuse de glucose (Dühlmeier *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2003a; Forhead *et al.*, 2004; Pratt *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2009; Peugnet *et al.*, 2015; Selim *et al.*, 2015). La seconde phase apparaitrait plutôt environ 1 heure après l'injection de glucose (Dühlmeier *et al.*, 2001; Pratt *et al.*, 2005; Waller *et al.*, 2006; Peugnet *et al.*, 2015; Selim *et al.*, 2015) mais n'est pas toujours observée (Forhead *et al.*, 2004; Toth *et al.*, 2009; Peugnet *et al.*, 2014).

2.1.2.3.2. Acides aminés

Les protéines stimulent la sécrétion d'insuline d'une manière moindre que le glucose. Cependant, tous les acides aminés n'ont pas la même action et ils agissent le plus souvent de concert. Ainsi la leucine, la glutamine, l'arginine, l'ornithine peuvent également induire la sécrétion d'insuline par plusieurs voies différentes chez l'homme (Wilcox, 2005; Fu *et al.*, 2013). Chez le cheval, la leucine potentialise l'effet d'une ingestion de glucose (Urschel *et al.*, 2010). De plus, l'injection intraveineuse d'arginine stimule la sécrétion d'insuline chez les poulains fœtus et âgés au moins jusqu'à 2 semaines (Fowden *et al.*, 1984b, 2005; Holdstock *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2015) et également chez le cheval adulte mais principalement chez la jument non gestante (la réponse était beaucoup plus faible chez le hongre

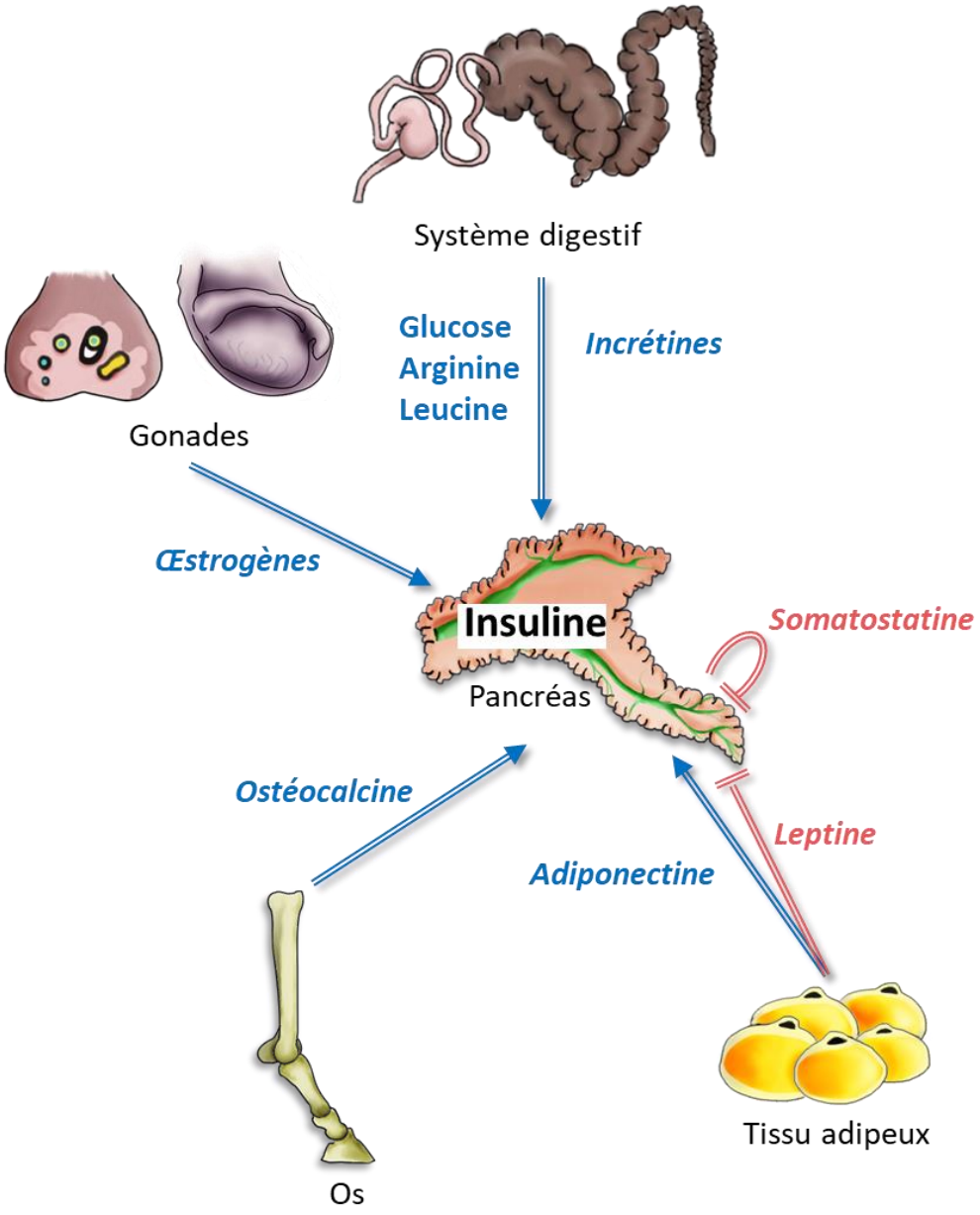


Figure A.14. Régulation de la synthèse d'insuline
La sécrétion d'insuline est régulée à la fois par les nutriments ingérés (**romain**) mais également par un grand nombre d'hormones (*italique*).
Les flèches bleues représentent les facteurs qui stimulent la sécrétion d'insuline, les flèches roses, les facteurs qui inhibent la sécrétion d'insuline.

et l'étalon) (Sticker *et al.*, 2001). Un test d'estimation de la régulation de l'homéostasie glucidique a ainsi été développé chez le cheval par injection intraveineuse d'arginine (Fowden *et al.*, 2005; Manfredi *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2015). Cependant la dose d'arginine injectée ne semble pas corrélée avec la réponse insulinémique, contrairement au glucose (Manfredi *et al.*, 2014). De plus, la réponse du pancréas à une consommation chronique d'arginine n'est pas connue chez le cheval.

2.1.2.3.3. Hormones (Figure A.14)

Les cellules β possèdent des récepteurs aux **œstrogènes** (Nadal *et al.*, 2000). Chez la souris, la 17-β-œstradiol augmente la sécrétion d'insuline en potentialisant l'effet du glucose (Nadal *et al.*, 1998; Ropero *et al.*, 2002).

Les **incrétines** (glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et Peptide insulinotrope dépendant du glucose (GIP)) sont sécrétées par le tractus gastro-intestinal après un repas (Baggio et Drucker, 2007; Irwin et Prentice, 2011). Chez l'homme, l'ingestion de glucose conduit à une production d'insuline plus importante que l'injection intraveineuse de glucose (Baggio et Drucker, 2007). Cette différence serait liée à la production de la GLP-1 et du GIP qui potentialisent la sécrétion d'insuline médiée par le glucose (Baggio et Drucker, 2007; Doyle et Egan, 2007). Chez le cheval et le poney, l'ingestion de glucose augmente la concentration plasmatique de GIP, alors qu'une injection intraveineuse de glucose ne modifie pas les concentrations de GIP (Dühlmeier *et al.*, 2001). Chez le cheval, l'effet de l'ingestion de glucose par rapport à l'injection intraveineuse n'a pas pu être étudié car les tests oraux sont réalisés avec des concentrations plus importantes de glucose que les tests intraveineux (Dühlmeier *et al.*, 2001; Schuver *et al.*, 2014).

La **leptine** est une adipokine sécrétée par les adipocytes et sa concentration augmente avec la quantité de masse grasse (Buff *et al.*, 2002; Gentry *et al.*, 2002; Kearns *et al.*, 2006). Cette hormone possède un effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline chez l'homme et la souris *in vitro* et *in vivo* (Fehmann *et al.*, 1997; Wilcox, 2005). Ainsi, la leptine serait capable d'avoir un effet antagoniste sur la concentration en AMPc intracellulaire des cellules β et inhiberait également la sécrétion d'insuline médiée par les incrétines (Poitout *et al.*, 1998; Ahren et Havel, 1999). Chez le cheval, le récepteur à la leptine a été détecté dans le pancréas (Dall'Aglio *et al.*, 2013). Les chevaux obèses résistants à la leptine (hyperleptinémiques) présentent une hyperinsulinémie, ce qui confirmerait l'effet de la leptine sur les cellules β pancréatiques chez le cheval (Cartmill *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2006). Si le pancréas n'est plus sensible à l'action inhibitrice de la leptine, cette hormone ne régulerait ainsi plus la sécrétion d'insuline.

Chez l'homme et le rongeur, les cellules β du pancréas expriment des récepteurs à l'**adiponectine** (Kharroubi *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2006). Comme la leptine, l'adiponectine est une adipokine sécrétée par les adipocytes. Cependant, à l'inverse de la leptine, sa concentration est inversement corrélée avec la quantité de masse grasse (Kearns *et al.*, 2006). L'adiponectine semble stimuler la sécrétion d'insuline par le pancréas chez les rongeurs *in vitro* et *in vivo* ainsi que la prolifération cellulaire (Gu *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2008; Wijesekara *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2014, 2015). Cependant, ces résultats ne sont pas toujours observés (Winzell *et al.*, 2004). La voie de signalisation par laquelle cette hormone module la sécrétion d'insuline n'est pas encore décrite puisque les résultats sont encore controversés (Gu *et al.*, 2006; Wijesekara *et al.*, 2010).

Les cellules δ du pancréas sont capables de produire de la **somatostatine**, inhibitrice de l'hormone de croissance (Low, 2004). La somatostatine, agit de manière paracrine et conduit à une repolarisation de la membrane et donc une inhibition de la libération de l'insuline (Rorsman et Braun, 2013). Chez le cheval, l'injection de somatostatine diminue la concentration en C-peptide dans la veine jugulaire, signifiant que la somatostatine a bien un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline par le pancréas dans cette espèce.

L'**ostéocalcine** est une hormone produite par les ostéoblastes. Les souris qui ne produisent pas d'ostéocalcine présentent une diminution de la prolifération des cellules β-pancréatiques associée à une diminution de la quantité d'insuline dans le pancréas (Lee *et al.*, 2007). Les ostéoblastes n'exprimant pas d'ostéocalcine ne sont pas capables de stimuler la production d'insuline par le pancréas (Ducy *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007). De plus, *in vitro*, l'ostéocalcine stimule la production d'insuline dans les cellules β et l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'insuline et la prolifération cellulaire (Lee *et al.*, 2007; Ferron *et al.*, 2008). L'action de l'ostéocalcine au niveau des cellules β passerait par un récepteur orphelin GPRC6A (Pi *et al.*, 2011). A l'heure actuelle, il semble qu'aucune étude portant sur l'effet de l'ostéocalcine sur la synthèse d'insuline n'ait été réalisée chez le cheval.

2.1.2.4. Facteurs physiologiques régulant la sécrétion d'insuline chez le cheval

2.1.2.4.1. Développement précoce

Chez le cheval, le pancréas du fœtus n'est capable de produire de l'insuline en réponse à une stimulation du glucose qu'à partir de 260 jours de gestation (Fowden *et al.*, 1980, 2005). La concentration plasmatique basale d'insuline chez le fœtus est stable de 160 jours de gestation à la naissance (Fowden *et al.*, 1980, 1984b, 2005). Elle augmente à partir de 8 heures *post-partum* en

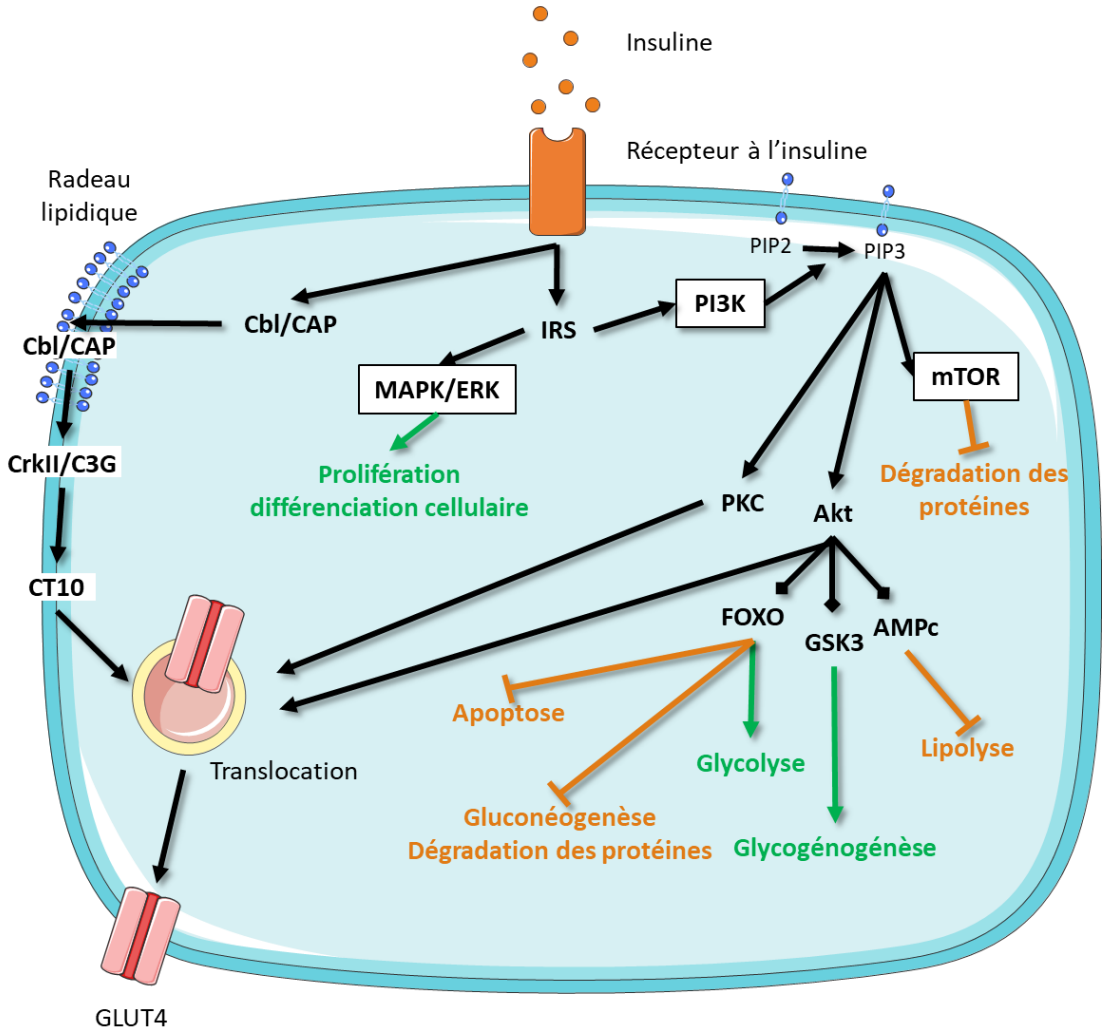


Figure A.15. Voies de signalisation activées par la liaison de l'insuline à son récepteur dans les cellules exprimant GLUT4

Il existe quatre voies principales (flèches orange : inhibition, flèches vertes : activation):

- Translocation du transporteur GLUT4 : La phosphorylation du complexe Cbl/CAP (casitas B-lineage lymphoma/Cbl associated protein) entraine leur translocation au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique. CrkII (CT10 regulator kinase II) est alors recrutée et forme un complexe avec la protéine C3G (Crk SH3-binding GNRP) qui, une fois à proximité de TC10, l'active. Cela va conduire à la translocation des récepteurs GLUT4 à la membrane plasmique.
- La voie PI3K (phospho-inositol-3-kinase) : La phosphorylation des IRS (insulin receptor substrate) entraine l'activation de la PI3K. Cela entraine la production des phosphatidylinositol-3-phosphates (PIP3). Les PIP3 phosphorylent alors la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1), ce qui entraine l'activation de la protéine kinase B (Akt) et de la protéine kinase C (PKC). Akt active la glycogénogenèse en inhibant la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), inhibe l'activité lipolytique en inhibant la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et inhibe la gluconéogenèse, la dégradation des protéines et l'apoptose et active la glycolyse en inhibant les facteurs de transcription Forkhead box O (FOXO). Akt et PKC stimulent également la translocation de GLUT4 à la membrane.
- La voie mammalian target of rapamycin (mTOR) : Les PIP3 activent la voie mTOR, ce qui conduit à une inhibition de la dégradation des protéines.
- La voie mitogen activated kinase/extracellular-signal regulated kinase (MAPK/ERK) : La phosphorylation des IRS entraine également l'activation de la voie MAPK/ERK, ce qui conduit à la prolifération ou la différenciation cellulaire.

réponse à la prise de colostrum (Fowden *et al.*, 2012). Après la naissance, à 1-2 jours post-partum, la réponse du pancréas au glucose et à l'arginine est moins importante qu'à 5-7 jours après la naissance mais également qu'en fin de gestation (Holdstock *et al.*, 2004; Fowden *et al.*, 2005). De plus, la capacité au pancréas à répondre dans les 10 minutes qui suivent l'injection de glucose tend à augmenter entre 5 jours et 160 jours post-partum chez les poulains (George *et al.*, 2009).

2.1.2.4.2. Gestation

Comme présenté en **partie 1.1.1.1**, la réponse des cellules β au glucose évolue durant la **gestation** : elle augmente en début de gestation afin de permettre à la jument de constituer des réserves puis diminue en fin de gestation afin de diriger le glucose en priorité vers le fœtus.

2.1.2.4.3. Vieillissement

Les travaux sur la capacité de production d'insuline par le pancréas liée au vieillissement sont presque inexistants chez le cheval. Les chevaux Trotteurs âgés en moyenne de 27 ans produisent plus d'insuline que les chevaux âgés en moyenne de 15 et de 6 ans en réponse à l'ingestion d'un bolus de glucose (Malinowski *et al.*, 2002). Il est possible, ce test ne permettant pas de distinguer les effets, qu'une diminution de la clairance de l'insuline chez les chevaux âgés renforce cet effet. De plus, un travail réalisé lors d'une thèse de doctorat à l'université du New Jersey montre que les juments Trotteur âgées (moyenne, 22 ans) ont une réponse aigue du pancréas à l'injection de glucose plus élevée que les jeunes juments (moyenne, 7 ans) (Liburt, 2011).

2.1.3. Effets physiologiques et voies de signalisation de l'insuline

2.1.3.1. Structure du récepteur à l'insuline

Le récepteur à l'insuline est constitué de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β intracellulaires. En absence d'insuline, les sous-unités α inhibent l'activité tyrosine kinase des sous-unités β (Saltiel et Kahn, 2001). Les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 peuvent former des hybrides fonctionnels.

2.1.3.2. Effets physiologiques et voies de signalisation

La liaison de l'insuline aux sous-unités α entraine une dé-répression de l'activité kinase des sous-unités β, ce qui conduit à une transphosphorylation des sous-unités β et à un changement conformationnel qui augmente l'activité kinase. Cela va entrainer une cascade de phosphorylations par plusieurs voies différentes décrites en Figure A.15. Le résumé des différents effets physiologiques de l'insuline est présenté en Figure A.16.

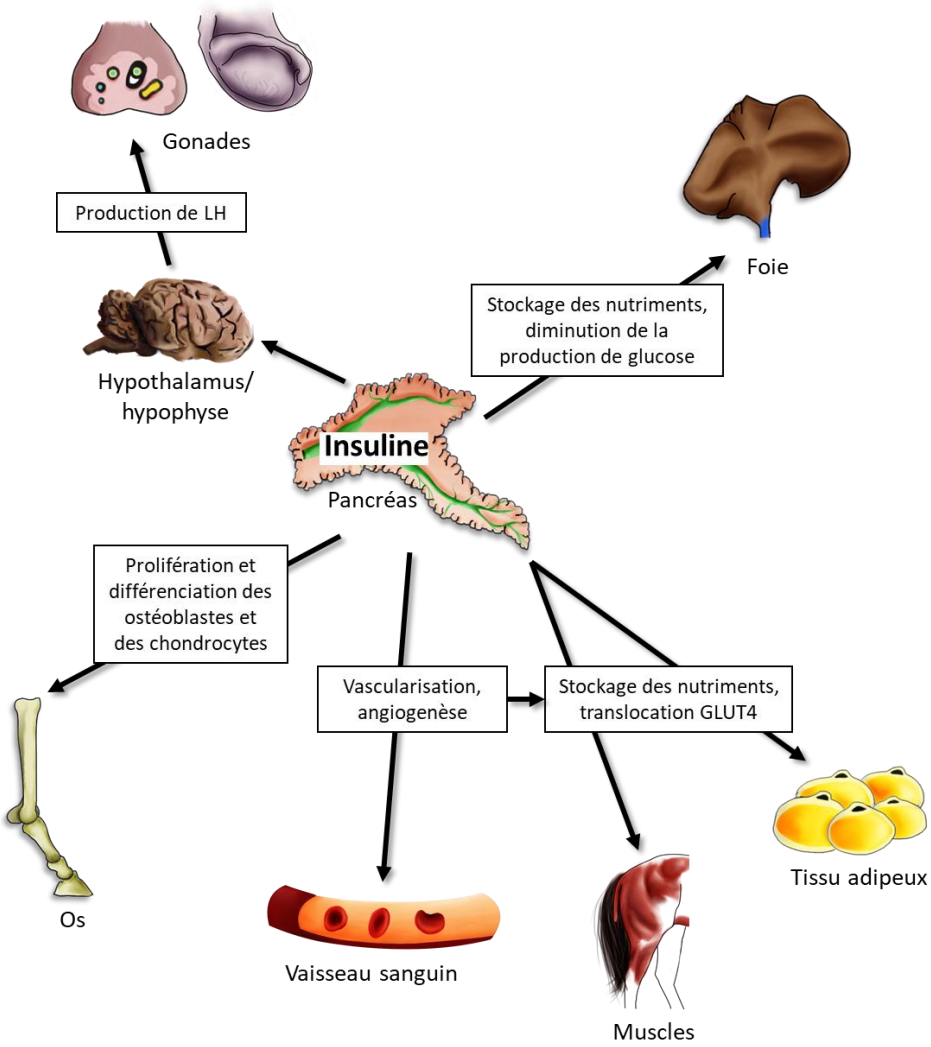


Figure A.16. Actions systémiques de l'insuline
L'insuline stimule le stockage des nutriments dans les tissus périphériques, la croissance osseuse, la vascularisation ainsi que la fonction de reproduction.

2.1.3.2.1. Régulation du métabolisme cellulaire

L'autophosphorylation des sous-unités β va permettre la phosphorylation en position tyrosine des membres de la famille des insulin receptor substrate (IRS) (Saltiel et Kahn, 2001). Par la suite, une chaîne de phosphorylations va conduire à l'activation de la voie phosphoinositol-3-kinase (PI3K) qui va entrainer l'activation de :

- Akt, qui entraine l'augmentation de l'activité de la glycogène synthase (Cross *et al.*, 1995), inhibe l'activité lipolytique de la cellule (Kitamura *et al.*, 1999) et inhibe les facteurs de transcription de la famille FoxO, inhibant ainsi, entre autres, la dégradation des protéines, la gluconéogenèse et activant la glycolyse (Stitt *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2014).
- mTOR, qui conduit à une inhibition de la dégradation des protéines (Raught *et al.*, 2001).

2.1.3.2.2. Stimulation de la translocation du transporteur GLUT4

La phosphorylation du proto-oncogène Cbl (Ribon et Saltiel, 1997), associé à la protéine adaptatrice CAP (Ribon *et al.*, 1998) entraine leur translocation au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Kimura *et al.*, 2001). Cela conduit alors à la formation d'un complexe qui catalyse les échanges GTP-GDP résultant à l'activation d'une protéine G (TC10). Cela va conduire à la translocation des récepteurs GLUT4 à la membrane plasmique (Chiang *et al.*, 2001). Akt et PKC sont également capables de stimuler la translocation de GLUT4 à la membrane (Wang *et al.*, 1999; Watson et Pessin, 2001; Imamura *et al.*, 2003; Mîinea *et al.*, 2005).

2.1.3.2.3. Croissance et différenciation cellulaire

La phosphorylation des IRS induit l'activation de la voie mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal regulated kinase (MAPK/ERK) qui conduit à la prolifération ou la différenciation cellulaire (Saltiel et Kahn, 2001). Les facteurs de transcription FoxO stimulent l'apoptose. Leur inhibition conduit donc à l'inhibition de la mort cellulaire programmée (Sanchez *et al.*, 2014).

2.1.3.2.4. Action sur les vaisseaux sanguins

L'activation de la voie PI3K/Akt par l'insuline stimule également l'angiogenèse (Liu *et al.*, 2009), Akt phosphorylant et stimulant l'activité de l'enzyme eNOS (Dimmeler *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2001; Muniyappa *et al.*, 2007) qui entraine la vasorelaxation des vaisseaux. L'insuline stimule également le recrutement des capillaires (Muniyappa *et al.*, 2007). L'activation de la voie MAPK/ERK stimule quant à elle la vasoconstriction (Potenza *et al.*, 2005, 2006; Muniyappa *et al.*, 2007). Cette augmentation de la vascularisation permet un apport plus important des nutriments vers les tissus cibles et donc une augmentation de leur stockage.

2.1.3.2.5. Action sur la croissance osseuse

Chez la souris et le rat, les ostéoblastes et les ostéoclastes expriment le récepteur à l'insuline et ce récepteur est fonctionnel (Thomas *et al.*, 1998; Ferron *et al.*, 2010a; Fulzele *et al.*, 2010a; Chen *et al.*, 2014). Cependant, il semblerait que l'action de l'insuline sur la croissance osseuse se fasse principalement *via* les ostéoblastes (Pramojanee *et al.*, 2014). La stimulation du récepteur à l'insuline dans les ostéoblastes stimule la sécrétion d'ostéocalcine (Ferron *et al.*, 2010a; Fulzele *et al.*, 2010a), hormone qui sera présentée en **partie 2.3**. L'insuline stimule la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes *in vitro* (Kream *et al.*, 1985; Pun *et al.*, 1989; Fulzele *et al.*, 2010a; Yang *et al.*, 2010; Pramojanee *et al.*, 2013, 2014) *via* les voies MAPK et PI3K/Akt (Ogata *et al.*, 2000; Kawamura *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010; Pramojanee *et al.*, 2013, 2014).

In vitro chez le poulet, sur des lignées cellulaires ou sur le rat, l'insuline stimule la maturation des chondrocytes : augmente la prolifération cellulaire, la différenciation et le dépôt de matrice (Böhme *et al.*, 1992; Phornphutkul *et al.*, 2006). De plus, des chondrocytes n'exprimant pas IRS-1 (impliqués en amont des voies MAPK et PI3K) ont une activité mitogénique diminuée, associée à une diminution de la phosphorylation d'Akt (Shimoaka *et al.*, 2004). *In vitro*, l'insuline stimule également la croissance cartilagineuse chez le rat (Maor *et al.*, 1993).

De plus, il a été montré chez l'homme que les personnes diabétiques de type I et de type II avaient des os moins solides, développaient plus de fractures et souffraient d'ostéoporose (De Liefde *et al.*, 2005; Vestergaard, 2007; Jackuliak et Payer, 2014; Pramojanee *et al.*, 2014). Ainsi l'absence ou la résistance à l'insuline aurait un effet délétère sur le remodelage osseux. De plus, les enfants obèses et résistants à l'insuline ont une croissance plus rapide associée à une puberté précoce et une fermeture précoce des plaques de croissance mais aussi des os moins solides avec des perturbations dans la zone de croissance (Skaggs *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2006; Valerio *et al.*, 2012; Kessler *et al.*, 2013; Streeter *et al.*, 2013; Dimitri *et al.*, 2015; Pollock, 2015) tandis que les enfants diabétiques ont une diminution de la masse osseuse durant la croissance (Wiske *et al.*, 1982; Thrailkill *et al.*, 2005; Parthasarathy *et al.*, 2016). L'augmentation ou la diminution de la masse osseuse liée à l'obésité infantile est quant à elle discutée (Pollock, 2015). Ainsi, l'insuline participe également au bon déroulement de la croissance osseuse durant la vie précoce.

Chez le cheval, il semble qu'une seule étude ait été réalisée. Il a été montré qu'*in vitro*, l'insuline est capable de promouvoir la survie et la prolifération des chondrocytes prélevés chez des fœtus en fin de gestation et un poulain de 4 jours (Henson *et al.*, 1997a). Il faudrait renouveler ces travaux pour définir si l'hyperinsulinémie est à l'origine d'un défaut de maturation conduisant à l'ostéochondrose *via* une action directe de l'insuline ou *via* la résistance à l'insuline (et donc l'action diminuée de l'insuline sur les chondrocytes).

2.1.3.2.6. Action sur la fonction de reproduction

Les souris n'exprimant pas le récepteur à l'insuline au niveau du cerveau ont une fertilité réduite associée avec une réduction du nombre de follicules antraux et de corps jaunes dans l'ovaire, une diminution du nombre de spermatozoïdes matures dans l'épididyme ainsi qu'une diminution de la concentration circulante de LH chez les mâles et les femelles (Bruning *et al.*, 2000). De même, les rats et les agneaux diabétiques ont une réduction de la fréquence des pulses de LH par rapport aux animaux témoins, l'injection d'insuline 2 fois par jour ramène les pulses de LH à la normale chez les rats diabétiques (Dong *et al.*, 1991; Bucholtz *et al.*, 2000). Cependant, l'insuline seule ne semble pas avoir dans tous les cas le pouvoir de modifier la réponse hypophysaire (Sliwowska *et al.*, 2014).
Aucune étude sur l'effet de l'insuline sur la fonction de reproduction ne semble avoir été réalisée sur l'espèce équine.

Par ces différentes voies, l'insuline va stimuler l'entrée du glucose (*via* GLUT4) et son stockage sous forme de glycogène, limiter l'activité lipolytique des cellules et augmenter le stockage du glucose sous forme de lipides ainsi qu'inhiber l'apoptose et stimuler la croissance et la différenciation des cellules cibles. L'insuline stimule également l'angiogenèse et la vascularisation des vaisseaux, la croissance et le remodelage osseux, ainsi que la fonction de reproduction.

2.2. Métabolisme des adipocytes

Le tissu adipeux est aujourd'hui considéré comme un organe endocrine (Kershaw *et al.*, 2014). Les adipocytes produisent des hormones appelées adipokines telles que la leptine, l'adiponectine et la resistine. Ils sont également capables de produire du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-1, IL-6.

2.2.1. Leptine

2.2.1.1. Description

La leptine est principalement synthétisée par les adipocytes. Son expression a cependant également été observée chez le cheval, l'homme et la souris dans le pancréas (Reddy *et al.*, 2003; Ehrström *et al.*, 2005; Dall'Aglio *et al.*, 2013), dans les glandes salivaires humaines (De Matteis *et al.*, 2002), au niveau de la muqueuse gastrique humaine (Cammisotto et Bendayan, 2012), de l'hypophyse ainsi que du placenta chez l'homme, le chat et les animaux de rente (Masuzaki *et al.*, 1997; Ashworth *et al.*, 2000; Keelan *et al.*, 2004; Dall'Aglio *et al.*, 2012; Kirat *et al.*, 2015).
Chez le cheval, la concentration en leptine plasmatique est positivement corrélée avec la note d'état et la quantité de gras corporelle (Buff *et al.*, 2002; Gentry *et al.*, 2002; Kearns *et al.*, 2006; Gordon *et*

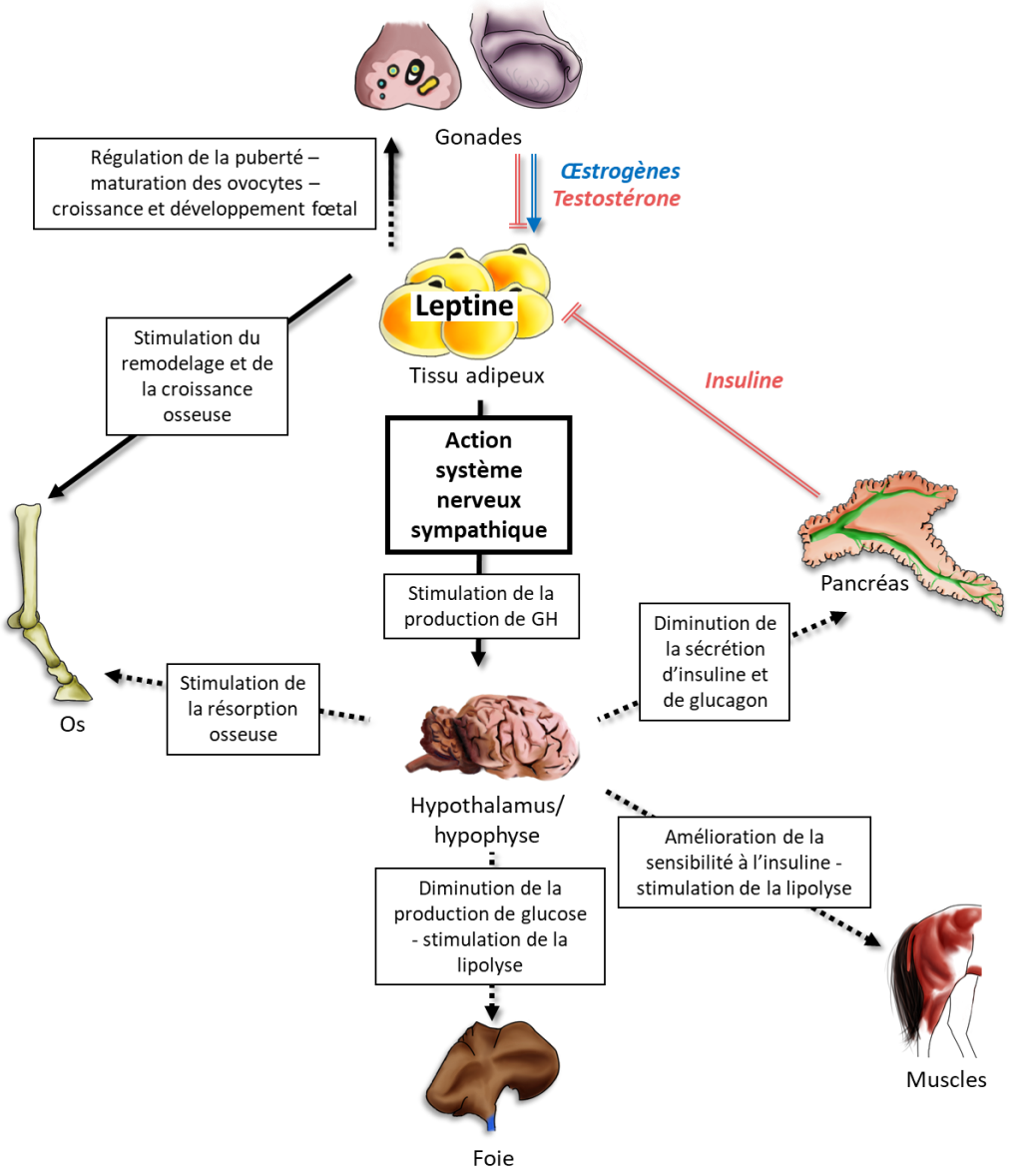


Figure A.17. Stimulation de la synthèse de leptine dans le tissu adipeux et actions systémiques de la leptine

La sécrétion de la leptine par le tissu adipeux est principalement régulée par le statut énergétique de l'individu (insuline, TSH) mais également par les hormones stéroïdes. La leptine régule le métabolisme énergétique, la croissance osseuse et la fonction de reproduction indirectement via le système nerveux sympathique (modulé par la quantité de glucose) ou en agissant directement.

Les flèches doublées correspondent aux facteurs qui stimulent ou inhibent la sécrétion de leptine : en bleu, les facteurs qui stimulent la sécrétion de leptine, en rose, les facteurs qui inhibent la sécrétion de leptine. Les flèches pleines et noires correspondent à l'action de la leptine directe dans les différents tissus, les flèches noires et en pointillés correspondent à l'action de la leptine via le système nerveux sympathique.

al., 2007; Huff *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 2009b; Pratt-Phillips *et al.*, 2010; Fradinho *et al.*, 2014; Bamford *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016) et varie d'une race à l'autre (Pratt-Phillips *et al.*, 2010). Cependant, pour une même note d'état, les concentrations en leptine peuvent varier d'un individu à l'autre, ce qui correspond à un état pathologique de résistance ou non chez les individus obèses (Gentry *et al.*, 2002; Cartmill *et al.*, 2003). Le récepteur à la leptine, OBR, existe en 5 isoformes (Fei *et al.*, 1997). L'isoforme OBRb est exprimé dans l'hypothalamus, les muscles, le cœur, les glandes surrénales, les reins, les adipocytes, les cellules immunitaires, le foie et les cellules pancréatiques (Kershaw *et al.*, 2014). C'est l'isoforme qui comporte une partie intracellulaire et des motifs peptidiques conduisant à l'activation de signaux de transduction.

2.2.1.2. Synthèse

La synthèse de leptine est stimulée par l'insuline chez le rat et la souris *in vitro* dans le tissu adipeux au travers de la voie PI3K (Barr *et al.*, 1997; Bradley et Cheatham, 1999; Moreno-Aliaga *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014) et chez l'homme et la vache *in vivo* (Kolaczynski *et al.*, 1996; Malmström *et al.*, 1996; Leury *et al.*, 2003). Chez l'homme et le rat, les œstrogènes *in vivo* ainsi que la thyréostimuline *in vitro* stimulent la sécrétion de leptine par le tissu adipeux (Elbers *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1997; Menendez *et al.*, 2003) tandis que chez l'homme la testostérone inhibe la sécrétion de leptine (Elbers *et al.*, 1997; Jockenhövel *et al.*, 1997; Wabitsch *et al.*, 1997; Perry *et al.*, 2000). Il a également été montré chez l'homme et le rat que l'injection d'hormone de croissance en une seule fois ou durant plusieurs mois inhibe cette sécrétion (Carro *et al.*, 1997; Kriström *et al.*, 1998). Chez les bovins, l'hormone de croissance présente le même effet *in vitro* (Houseknecht *et al.*, 2000) mais l'effet contraire ou une absence d'effet *in vivo* (Houseknecht *et al.*, 2000; Leury *et al.*, 2003) a aussi été observé. *In vitro*, chez la souris l'ostéocalcine ne semble pas réguler la synthèse de leptine dans le tissu adipeux (Lee *et al.*, 2007).

La Figure A.17 résume les effets physiologiques de la leptine sur l'organisme.

2.2.1.3. Action sur l'appétit

Le rôle principal de la leptine est de contrôler l'appétit en limitant l'apport alimentaire *via* son action sur l'hypothalamus : la leptine inhibe la synthèse de sérotonine et augmente le tonus sympathique (Elmquist, 2001; Klok *et al.*, 2007; Riddle et Clemens, 2017). De plus, il a été montré que l'action de la leptine sur les neurones hypothalamiques varie en fonction de la disponibilité en glucose : la leptine inhibe l'activité de ces neurones lorsque la concentration en glucose est élevée mais stimule cette activité lorsque la concentration en glucose est faible (Lee *et al.*, 2015).

2.2.1.4. Action sur le métabolisme énergétique

L'action de la leptine sur le métabolisme énergétique et la dépense énergétique passerait principalement par le système nerveux sympathique (Yadav *et al.*, 2009). Comme vu dans le paragraphe *2.1.2.3.4.*, la leptine stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas. La leptine inhibe également la sécrétion de glucagon chez la souris de façon indépendante de l'insuline (Tudurí *et al.*, 2009; German *et al.*, 2011). La leptine augmente également la sensibilité à l'insuline et diminue la production de glucose hépatique indépendamment des régulations d'appétit et de poids (Berglund *et al.*, 2012). Dans le muscle squelettique, la leptine active la voie Akt *via* son action hypothalamique et augmente ainsi la sensibilité du tissu à l'insuline (Andreelli *et al.*, 2006; Roman *et al.*, 2010). De plus, son action *via* le système nerveux sympathique stimule la lipolyse du foie, du tissu adipeux et des muscles et limite donc l'accumulation des triglycérides (Park et Ahima, 2015). L'accumulation des triglycérides dans ces cellules altère leur sensibilité à l'insuline (Saito *et al.*, 1999). Les chevaux obèses résistants à l'insuline ont une concentration plasmatique de leptine beaucoup plus élevée que les chevaux non obèses non résistants à l'insuline (Cartmill *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2006). Cela indiquerait une résistance à la leptine associée à une résistance à l'insuline. La leptine stimulerait également la synthèse d'hormone de croissance comme cela a été montré *in vivo* chez le rat (Carro *et al.*, 1997; Tannenbaum *et al.*, 1998), le porc (Barb *et al.*, 1998) et le mouton (Nagatani *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2001).

2.2.1.5. Action sur le métabolisme osseux

2.2.1.5.1. Système nerveux sympathique

Les ostéoblastes possèdent des récepteurs β2-adrénergiques fonctionnels (Takeda *et al.*, 2002). La leptine inhibe la synthèse de sérotonine et augmente le tonus sympathique (Ozata *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2015), ce qui conduit à l'inhibition de la prolifération des ostéoblastes (Benovic *et al.*, 1988; Fu *et al.*, 2005; Chen et Yang, 2015) et la stimulation de la différenciation des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse en ostéoclastes et donc de la résorption osseuse (Ducy *et al.*, 2000; Elefteriou *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2005; Karsenty, 2006; Yadav *et al.*, 2009; Riddle et Clemens, 2017). Cette action serait liée à l'activation du gène *Esp* par le tonus hypothalamique, qui code pour l'osteotesticular protein tyrosine phosphatase (OST-PTP) qui déphosphoryle le récepteur à l'insuline des ostéoblastes et donc inhibe l'action de l'insuline sur ces cellules (Hinoi *et al.*, 2009; Yoshizawa *et al.*, 2009). L'action de la leptine passerait également *via* la neuromédine U et le neuropeptide Y, également synthétisés par l'hypothalamus. Ces neuropeptides inhiberaient également la croissance osseuse (Liu *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2007; Cirmanová *et al.*, 2008; Baldock *et al.*, 2009; Lee et Herzog, 2009; Shi et Baldock, 2012). ***Via* le système nerveux central, la leptine semble inhiber la croissance et stimuler la résorption osseuse.**

2.2.1.5.2. Voies périphériques

Les chondrocytes hypertrophiques expriment le récepteur à la leptine (Cornish *et al.*, 2002; Kishida *et al.*, 2005). De plus, les souris ne produisant pas de leptine ou son récepteur ont des os plus fragiles au niveau de la jonction chondro-osseuse, présentent une déstructuration des colonnes du cartilage de croissance, une augmentation de la mort cellulaire et une minéralisation prématurée (Hamrick *et al.*, 2004; Kishida *et al.*, 2005; Ealey *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2011). L'injection de leptine *in vivo* entraine une augmentation de la longueur des os, réduit la fragilité osseuse et la longueur de la zone hypertrophique calcifiée (Cornish *et al.*, 2002; Kishida *et al.*, 2005). La leptine stimule également l'expression du récepteur à l'IGF-1 dans le cartilage de la plaque de croissance et la prolifération des chondrocytes (Cornish *et al.*, 2002; Maor *et al.*, 2002; Kishida *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré sur des lignées de chondrocytes murins que la leptine stimule l'expression d'ostéocalcine (ARNm et protéine) *via* la voie ERK (Han *et al.*, 2016).
Les cellules stromales mésenchymateuses expriment également le récepteur à la leptine (Thomas *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2005). La leptine stimule la différenciation de ces cellules dans le lignage ostéoblastique et inhibe leur différenciation dans le lignage adipocytaire (Thomas *et al.*, 1999; Astudillo *et al.*, 2008).
Les ostéoblastes expriment également le récepteur à la leptine (Cornish *et al.*, 2002; Grundberg *et al.*, 2008). La leptine stimule la prolifération des ostéoblastes, la synthèse de collagène *de novo*, la minéralisation et la survie cellulaire (Reseland *et al.*, 2001; Cornish *et al.*, 2002; Gordeladze *et al.*, 2002). De plus, la leptine stimule la synthèse d'ostéocalcine par les ostéoblastes *in vitro* chez l'homme (Gordeladze *et al.*, 2002).
La leptine joue donc un rôle important dans l'ossification endochondrale de la plaque de croissance. ***Via* les voies périphériques la leptine semble stimuler la croissance et la formation osseuse et inhiber la résorption osseuse**.
La leptine a donc une action inhibitrice de la croissance osseuse *via* le système nerveux central et stimulatrice *via* des actions périphériques.
L'action périphérique de la leptine nécessite une concentration de leptine plus faible que son action hypothalamique du fait :

- De la saturation des transporteurs au travers de la barrière hémato-encéphalique (Banks *et al.*, 1996)
- De la sensibilité importante des ostéoblastes et du cartilage de la plaque de croissance à de très faibles concentrations de leptine (Philbrick *et al.*, 2017)

Cette action pourrait donc prévaloir sur la voie hypothalamique dans un cadre non pathologique (Philbrick *et al.*, 2017).

De plus, les actions de la leptine peuvent varier en fonction de l'âge de l'individu, de son statut métabolique, de son espèce ainsi que du site anatomique étudié (Hamrick *et al.*, 2004; Riddle et Clemens, 2017).

Chez le cheval, il semble qu'aucune étude n'ait été réalisée *in vivo* ou *in vitro* sur les effets de la leptine sur la croissance et le développement osseux.

2.2.1.6. Action sur la fonction de reproduction

2.2.1.6.1. Puberté

Chez la génisse et les porcelets et les adolescentes humaines, la concentration en leptine sérique augmente avec l'avancée de la puberté (García-mayor *et al.*, 1997; Qian *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2002). Une restriction alimentaire courte chez des génisses, associée avec une diminution de la sécrétion de leptine, diminue la fréquence des pulses de LH chez les animaux prépubères, mais pas chez des vaches matures. Une injection de leptine permet de ramener à la normale la sécrétion de LH chez les génisses prépubères (Amstalden *et al.*, 2002). Enfin, chez la souris, l'injection de leptine avance l'âge à la puberté (Ahima *et al.*, 1997).

Peu d'études ont été réalisées sur l'effet de la leptine sur la puberté chez le cheval. Il a été montré que les juments matures avaient une concentration en leptine plasmatique plus importante que les jeunes juments mais qu'elles exprimaient également plus la leptine et son récepteur dans les ovocytes et que ces concentrations de leptine étaient corrélées avec la maturation ovocytaire (Cebulj-Kadunc *et al.*, 2009; Lange-consiglio *et al.*, 2013). De plus, cette concentration varie avec les saisons chez les juments pubères mais pas chez les juments prépubères (Cebulj-Kadunc *et al.*, 2009).

2.2.1.6.2. Reproduction

Il a été montré chez les juments qu'au moment des chaleurs de lait, la concentration plasmatique d'œstradiol était positivement corrélée à la concentration plasmatique en leptine (El-Maaty et Gabr, 2010). De plus, au cours du cycle, les juments ont une concentration plasmatique en leptine plus importante en phase folliculaire qu'en anœstrus et les juments qui n'ont pas d'arrêt du cycle (cycle même en hiver), ont une concentration plasmatique plus élevée que les juments qui sont en anœstrus jusqu'au printemps (Ferreira-dias *et al.*, 2005; Cebulj-Kadunc *et al.*, 2009). *In vitro*, la leptine régule la maturation de l'ovocyte chez la jument et améliore la fécondation par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) (Consiglio *et al.*, 2009). De plus, il a été observé que les juments en syndrome métabolique tendaient à avoir une concentration en leptine dans le fluide folliculaire plus importante que les juments saines, cette concentration étant positivement corrélée à la concentration en leptine sérique (Sessions-Bresnahan et Carnevale, 2014). Du fait de son expression et de l'expression de son récepteur dans l'ovocyte (Lange-consiglio *et al.*, 2013), la leptine jouerait donc un rôle important dans

l'ovulation, à la fois au niveau systémique et au niveau autocrine/paracrine, ce qui expliquerait en partie pourquoi les juments en état corporel insuffisant et/ou sous-nourries ont une période d'anœstrus plus longue (Guillaume *et al.*, 2006; Morley et Murray, 2014). Cette corrélation n'est pas observée chez l'étalon, que ce soit avec l'œstradiol ou avec la testostérone (El-Maaty *et al.*, 2014).

2.2.1.6.3. Gestation

La leptine est également produite par le placenta chez l'homme (Masuzaki *et al.*, 1997; Ashworth *et al.*, 2000), les rongeurs (Ashworth *et al.*, 2000), les ovins et les porcins (Ashworth *et al.*, 2000), les bovins (Keelan *et al.*, 2004) ainsi que les lapins (Kirat *et al.*, 2015). Son expression dans le placenta équin n'a pas encore été démontrée, cependant, au stade 8 cellules, l'embryon équin exprime la protéine leptine ainsi que son récepteur (Consiglio *et al.*, 2009). Le rôle de la leptine au cours de la gestation a été principalement étudié dans les cas pathologiques chez l'homme (Sagawa *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2014). De plus, chez la femme, la souris, la ratte et la brebis, les concentrations plasmatiques ou sériques de leptine en gestation sont beaucoup plus importantes que chez des individus non gestants (Ehrhardt *et al.*, 2001; Reitman *et al.*, 2001). Ainsi, un rôle de la leptine dans la croissance et le développement fœtal a été suggéré (Forhead et Fowden, 2009).

La leptine joue donc le rôle de détecteur de l'état nutritionnel de l'individu et régule donc en retour l'appétit, le métabolisme énergétique, la croissance osseuse et la fonction de reproduction par action indirecte *via* le système nerveux sympathique, dépendant de l'état nutritionnel ou par action directe.

2.2.2. Adiponectine

2.2.2.1. Description

L'adiponectine est synthétisée presque uniquement par le tissu adipeux en proportion inverse de la quantité de tissu adipeux chez de nombreuses espèces et également chez le cheval (Kearns *et al.*, 2006; Wooldridge *et al.*, 2012). Chez l'homme, on observe une corrélation inverse entre la concentration en adiponectine et la quantité de tissu adipeux. Cette corrélation est plus importante pour le tissu adipeux viscéral que pour le tissu adipeux sous-cutané (Asayama *et al.*, 2003; Cnop *et al.*, 2003; Lenchik *et al.*, 2003; Staiger *et al.*, 2003). Il existe deux récepteurs à l'adiponectine : AdipoR1 et AdipoR2 (Waki *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2003a; Fasshauer *et al.*, 2004). AdipoR1 et AdipoR2 sont exprimés dans les ostéoblastes, le cerveau, le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique (Yamauchi *et al.*, 2003a; Fasshauer *et al.*, 2004; Yadav *et al.*, 2013).

2.2.2.2. Synthèse

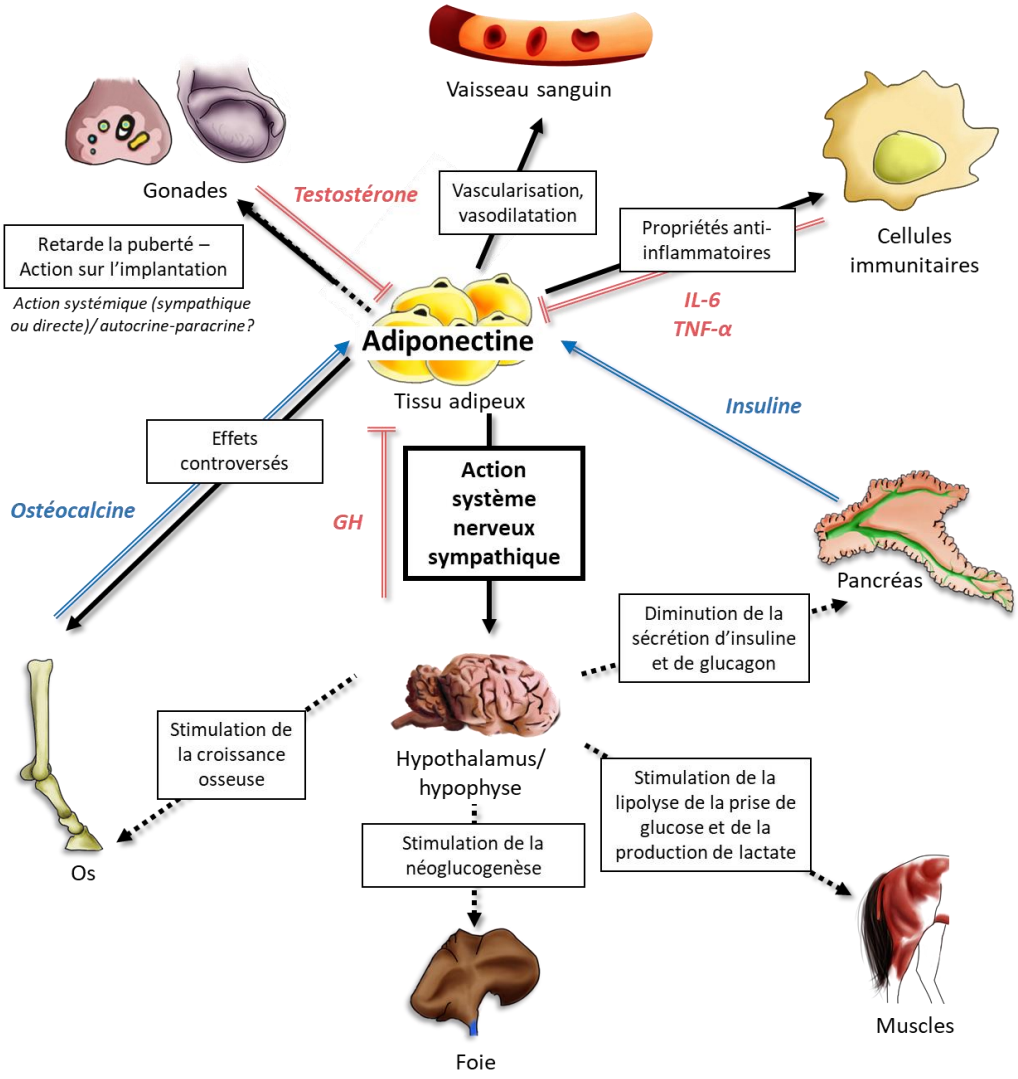


Figure A.18. Stimulation de la synthèse d'adiponectine dans le tissu adipeux et actions systémiques de l'adiponectine

La sécrétion de l'adiponectine par le tissu adipeux est régulée par le statut énergétique de l'individu (insuline, GH), par la testostérone et par les facteurs pro-inflammatoires. L'adiponectine régule le métabolisme énergétique, la vascularisation, l'inflammation systémique, la croissance osseuse et la fonction de reproduction indirectement via le système nerveux sympathique (modulé par la quantité de glucose) ou en agissant directement.

Les flèches doublées correspondent aux facteurs qui stimulent ou inhibent la sécrétion de l'adiponectine : en bleu, les facteurs qui stimulent la sécrétion de l'adiponectine, en rose, les facteurs qui inhibent la sécrétion de l'adiponectine. Les flèches pleines et noires correspondent à l'action de l'adiponectine directe dans les différents tissus, les flèches noires et en pointillés correspondent à l'action de l'adiponectine via le système nerveux sympathique.

Chez l'homme et la souris, *in vitro*, l'insuline stimule la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes *via* la voie PI3K (Motoshima *et al.*, 2002; Blümer *et al.*, 2008; Groeneveld *et al.*, 2016). La testostérone inhibe la sécrétion d'adiponectine *in vivo* chez la souris (Nishizawa *et al.*, 2002). De plus, les cytokines IL-6 et TNF-α inhibent la sécrétion d'adiponectine *in vitro* chez la souris et l'homme et *in vivo* chez l'homme (Kappes et Löffler, 2000; Maeda *et al.*, 2001; Fasshauer *et al.*, 2003). Enfin, la prolactine et l'hormone de croissance inhibent la sécrétion d'adiponectine *in vitro* chez l'homme et *in vivo* chez la souris (Nilsson *et al.*, 2005). Chez la souris, *in vitro* et *in vivo*, l'ostéocalcine stimule la production d'adiponectine dans les adipocytes (Lee *et al.*, 2007; Otani *et al.*, 2015).

La Figure A.18 résume les effets physiologiques de l'adiponectine sur l'organisme.

2.2.2.3. Action sur le métabolisme énergétique

L'action principale de l'adiponectine sur le métabolisme énergétique est l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Dans les cellules musculaires, l'adiponectine stimule la β-oxydation des acides-gras, ainsi que l'entrée du glucose et la production de lactate (Yamauchi *et al.*, 2001, 2002, 2003b; Minokoshi *et al.*, 2002; Tomas *et al.*, 2002). Dans le foie, l'adiponectine stimule également la néoglucogenèse (Combs *et al.*, 2004). Enfin, l'adiponectine stimule la « disposition » du glucose (entrée du glucose) dans le tissu adipeux (Wu *et al.*, 2003). L'adiponectine a donc à la fois une action sur les cellules musculaires, les cellules hépatiques et les adipocytes. Ces actions sont directes mais aussi indirectes *via* le système nerveux sympathique (Qi *et al.*, 2004). De la même manière que pour la leptine, il a été montré que l'action de l'adiponectine sur les neurones hypothalamiques était régulée par la concentration en glucose : une concentration élevée en glucose entraîne une inhibition de l'activité des neurones hypothalamiques tandis qu'une concentration basse en glucose entraîne une activation de cette activité par l'adiponectine (Suyama *et al.*, 2016).

2.2.2.4. Action sur l'inflammation

L'adiponectine aurait une action anti-inflammatoire puissante. L'adiponectine diminue *in vitro* la sécrétion des cytokines TNF-α et interferon-γ (IFN-γ), les activités de phagocytose et des métalloprotéases ainsi que la sensibilité aux stimuli pro-inflammatoires des macrophages (Yokota *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2004; Tsatsanis *et al.*, 2005). L'adiponectine induit également la production de cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-10 et l'antagoniste au récepteur de l'IL-1 par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques chez l'homme (Wolf *et al.*, 2004). De plus, en cas d'obésité et de résistance à l'insuline, les concentrations plasmatiques faibles d'adiponectine sont corrélées avec des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires (Engeli *et al.*, 2003; Ouchi *et al.*, 2003a, b). L'adiponectine aurait également un rôle dans la prévention de l'athérosclérose chez

l'homme (Ouchi *et al.*, 2011). Chez le cheval, la note d'état corporelle est positivement corrélée avec l'expression des ARNm sanguins d'IL-1 et TNF-α (Vick *et al.*, 2007). De plus, une surnutrition à base d'un aliment riche en sucres diminue la concentration plasmatique d'adiponectine et augmente très fortement la concentration plasmatique en sérum amyloïde A (SAA) chez le cheval sans modifier la concentration en TNF-α (Bamford *et al.*, 2015).

Cependant, dans le cadre de pathologies humaines auto-immunes (ostéoarthrite, maladie de Crohn, diabète de type I, allergies et asthme), des niveaux élevés d'adiponectine sont associés à des inflammations chroniques localisées (Fantuzzi, 2008). L'action de l'adiponectine sur l'inflammation pourrait donc dépendre du contexte et/ou du tissu.

2.2.2.5. Action sur les vaisseaux sanguins

L'adiponectine stimule l'expression et l'activité de l'enzyme endothelial nitric oxyde synthase (eNOS) dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* (Chen *et al.*, 2003; Hattori *et al.*, 2003; Ouchi *et al.*, 2003c, 2004; Xi *et al.*, 2005; Ohashi *et al.*, 2006). De plus, l'adiponectine stimule la migration et la différenciation des cellules endothéliales en structures de type capillaires *in vitro* et inhibe l'apoptose de ces cellules (Kobayashi *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004; Ouchi *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2005). Ainsi, il a été montré que les hommes souffrant d'hypertension ont une adiponectinémie plus faible que les hommes sains (Iwashima *et al.*, 2004).

2.2.2.6. Action sur le métabolisme osseux

2.2.2.6.1. Système nerveux sympathique

A l'instar de la leptine, l'adiponectine a également une action *via* le système nerveux sympathique. Elle agit en stimulant la production de sérotonine et en diminuant le tonus sympathique à l'inverse de la leptine et donc en stimulant la prolifération des ostéoblastes et le remodelage osseux *via* cette voie et également en antagonisant l'action hypothalamique de la leptine (Kajimura *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014a; Riddle et Clemens, 2017).

2.2.2.6.2. Voies périphériques

Les actions endocrines de l'adiponectine *in vitro* et *in vivo* sont controversées. Il a été montré que les ostéoblastes et les ostéoclastes exprimaient les deux récepteurs à l'adiponectine ainsi que l'hormone elle-même (Berner *et al.*, 2004; Shinoda *et al.*, 2006).

In vitro chez l'homme et la souris l'adiponectine stimule la prolifération des ostéoblastes (Luo *et al.*, 2005; Kanazawa *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2009). L'adiponectine stimule également la différenciation des pré-ostéoblastes *via* une stimulation des activités alkaline phosphatase et de minéralisation et la

différenciation des cellules stromales mésenchymateuses en ostéoblastes de manière endocrine ou paracrine/autocrine (Luo *et al.*, 2005; Oshima *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009). De plus, il semble que l'adiponectine agisse en synergie avec l'insuline pour potentialiser son action de stimulation de la prolifération des cellules stromales mésenchymateuses (Shinoda *et al.*, 2006).

Cependant*, in vitro*, l'adiponectine stimule l'expression du *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (*Rankl)*, un gène exprimé par les ostéoblastes et impliqué dans la différenciation cellules progénitrices en ostéoclastes (Lacey *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2006; Kajimura *et al.*, 2013). *In vivo*, l'action directe de l'adiponectine chez la souris stimule la différenciation des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse en ostéoclastes, inhibe la prolifération et stimule l'apoptose des ostéoblastes, inhibe la sécrétion d'ostéocalcine par les ostéoblastes et donc stimule la résorption osseuse (Kajimura *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Abbott *et al.*, 2015).

Comme pour la leptine, les actions controversées de l'adiponectine sur le développement osseux impliquent une régulation fine des effets de cette hormone sur l'équilibre des différentes populations osseuses ainsi que leur activité, des effets doses, une régulation systémique de l'action de l'adiponectine *via* d'autres facteurs, le statut métabolique, l'âge de l'individu, son espèce ainsi que le site anatomique et les cellules étudiées.

Chez le cheval, il semble qu'aucune étude n'ait été réalisée *in vivo* ou *in vitro* sur les effets de l'adiponectine sur la croissance et le développement osseux.

2.2.2.7. Action sur la fonction de reproduction

2.2.2.7.1. Puberté

Chez l'homme, les concentrations plasmatiques en adiponectine diminuent au cours de la puberté et sont moins importantes après la puberté qu'avant, en particulier chez les garçons (du fait de l'action de la testostérone sur la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux) (Böttner *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2007). Chez les enfants obèses, les concentrations en adiponectine sont moins importantes que chez les enfants sains (Böttner *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2005).

Chez le cheval, il a été montré que l'adiponectine et ses récepteurs étaient exprimés dans les cellules de Leydig et les tubes séminifères des étalons prépubères et adultes et que l'expression de l'adiponectine était augmentée chez les jeunes mâles (Pearson, 2015).

2.2.2.7.2. Reproduction

Chez les animaux de rente, les récepteurs à l'adiponectine et l'adiponectine sont exprimés dans l'ovocyte, les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa des vaches et son expression évolue en fonction du stade de maturation du follicule (Maillard *et al.*, 2010; Tabandeh *et al.*, 2010) et dans l'ovocyte, le complexe cumulus-ovocyte et l'embryon précoce des truies (Chappaz *et al.*, 2008). Chez

la vache, l'adiponectine inhibe la stéroïdogenèse induite par l'insuline dans les cellules de la granulosa et stimule la prolifération de ces cellules mais n'a pas d'action sur la maturation des ovocytes et le développement de l'embryon *in vitro* (Maillard *et al.*, 2010).

2.2.2.7.3. Gestation

Chez le cheval, l'adiponectine et ses récepteurs sont exprimés dans les épithéliums glandulaire et luminal de l'endomètre de la jument vide et gestante à 8 et 16 jours et que l'expression de ces gènes augmentait entre 8 et 16 jours de gestation (Pearson, 2015). Les récepteurs à l'adiponectine sont également exprimés dans les endomètres humains, porcins, murins et de lapines (Lord *et al.*, 2005; Takemura *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Les cytokines pro-inflammatoires inhiberaient l'expression de l'adiponectine placentaire chez l'homme mais stimuleraient l'expression du récepteur AdipoR1 (Chen *et al.*, 2006). Chez l'homme, *in vitro*, l'adiponectine inhibe la prolifération et stimule la différenciation et la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques *via* une augmentation des activité métalloprotéase (Benaitreau *et al.*, 2009, 2010). L'adiponectine aurait alors un rôle dans l'implantation du conceptus. Chez la truie et la souris, l'adiponectine stimule le développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste *in vitro* (Chappaz *et al.*, 2008; Čikoš *et al.*, 2010).

A l'instar de la leptine, l'adiponectine a un rôle de senseur de l'état nutritionnel de l'individu et régule le métabolisme énergétique, la vascularisation, l'inflammation systémique, la croissance osseuse et la fonction de reproduction par action indirecte *via* le système nerveux sympathique en fonction de l'état nutritionnel ou par action directe. Ses actions sont en majorité en miroir avec celles de la leptine.

2.3. Cytokines pro-inflammatoires

2.3.1. Définition

Les cellules du système immunitaire, le tissu adipeux et les muscles sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-7, IL-8, IL-1 et TNF-α (Ruan et Lodish, 2003; Dinarello, 2007; Makki *et al.*, 2013; Peake *et al.*, 2015). Ces cytokines induisent notamment la production par le foie de SAA, protéine de l'immunité innée, utilisée comme marqueur de l'inflammation chez le cheval (Pepys *et al.*, 1989; Jacobsen et Andersen, 2007; Zhou *et al.*, 2015). Le SAA serait également exprimé par le tissu adipeux, au moins chez l'homme (Sjöholm *et al.*, 2005). TNF-α a deux récepteurs, TNF-R1 et TNF-R2 qui sont exprimés de manière ubiquitaire (Cawthorn et Sethi, 2008).

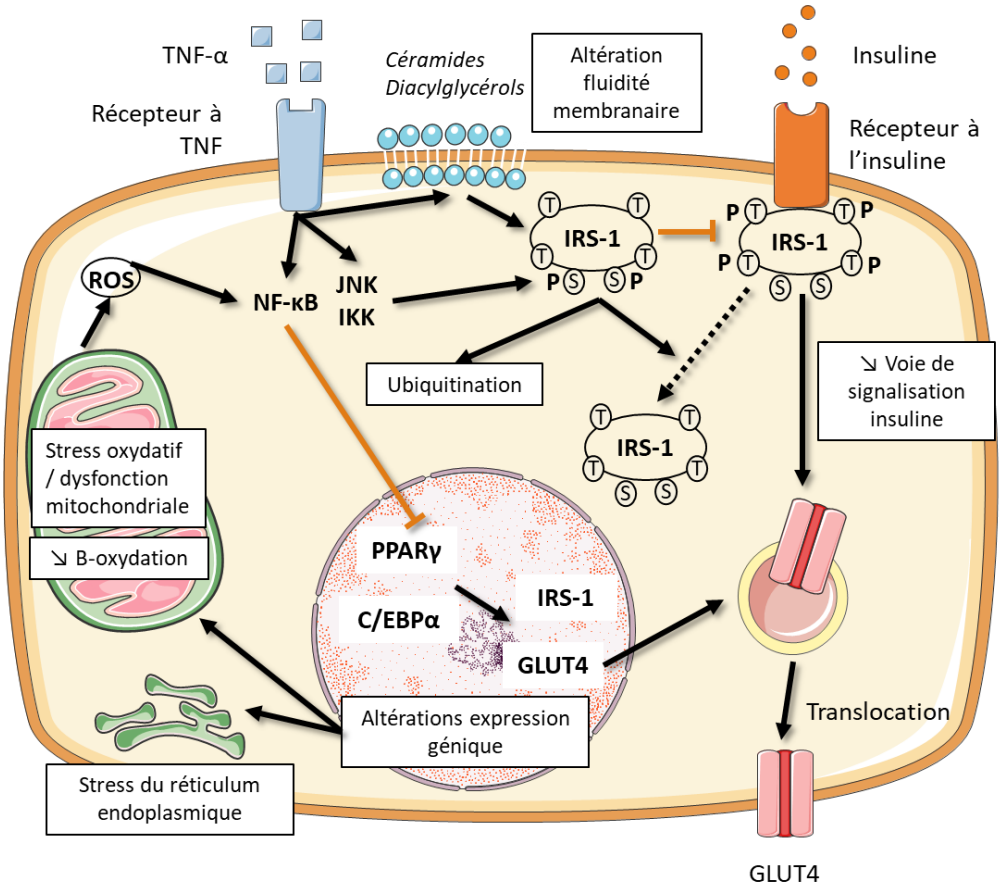


Figure A.19. TNF-α diminue la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques
Le facteur de nécrose tumorale α (TNF-α) inhibe la translocation de GLUT4 à la membrane en phosphorylant l'insulin receptor subtrate 1 (IRS-1) en position sérine, ce qui conduit au découplage d'IRS-1 du récepteur à l'insuline et à son ubiquitiation et donc à une diminution de la voie de signalisation. De plus, TNF-α inhibe l'expression de *GLUT4* et *IRS-1* en inhibant l'expression des facteurs de transcription Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) et CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBPα). TNF-α modifie également la composition de la membrane plasmatique, ayant des effets sur la fluidité membranaire et participant également à la phosphorylation d 'IRS-1. Via son action sur l'expression génique, TNF-α stimule également la dysfonction mitochondriale et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui potentialisent l'action de TNF-α via les voies janus kinase (JNK) et nuclear factor κ B (NF-κB).

2.3.2. Synthèse

Comme montré au paragraphe **2.2.2.4.**, l'adiponectine inhibe la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les cellules immunitaires. D'autre part, la leptine stimule la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et la sécrétion de protéines de l'immunité innée par le foie et le tissu adipeux (Loffreda *et al.*, 1998; Ahren et Havel, 1999; Lin *et al.*, 2001; Aleffi *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; Lam et Lu, 2007; Hribal *et al.*, 2014). L'insuline (hyperinsulinémie) stimule la sécrétion de TNF-α *in vitro* et *in vivo* (Coppack, 2001). TNF-α stimule l'expression des autres cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, le tissu adipeux et les muscles (Stephens *et al.*, 1992; Rotter *et al.*, 2003; Chevrel *et al.*, 2005; Parameswaran et Patial, 2010).

2.3.3. Action sur le métabolisme énergétique

2.3.3.1. TNF-α

TNF-α est la cytokine qui a été le plus étudiée et pour laquelle l'action est la mieux connue. Les actions de TNF-α sur la sensibilité à l'insuline sont présentées en Figure A.19.

Diminution de la voie de signalisation de l'insuline : La phosphorylation d'IRS-1 suite à la liaison de l'insuline à son récepteur peut se faire en position tyrosine et alors activer les voies qui vont conduire à la translocation de GLUT4 et aux effets connus de l'insuline sur les tissus cibles (voir paragraphe *2.3.1.2.1*). *Via* les voies janus kinase (JNK) et IκB kinase (IKK), TNF-α stimule la phosphorylation d'IRS-1 en position sérine, ce qui découple IRS du récepteur à l'insuline, réduit la phosphorylation en position tyrosine, envoie IRS-1 vers le système d'ubiquitination et donc diminue l'action de l'insuline (Hotamisligil *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2002; White, 2002; Borst, 2004; Cawthorn et Sethi, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Boura-Halfon et Zick, 2009). De plus, TNF-α *via* la voie nuclear factor kappa B (NF-κB) inhibe l'expression de PPARγ et C/EBPα qui sont deux facteurs de transcription qui stimulent la prolifération des préadipocytes en adipocytes matures (Farmer, 2006). Cela va donc entrainer une diminution de l'expression de gènes tels que *GLUT4, Adiponectine* et *IRS-1* (Jain *et al.*, 1999; Nieto-Vazquez *et al.*, 2008).

TNF-α peut altérer la composition de la membrane plasmique en augmentant la disponibilité des lipides réactifs tels que les diacylglycérols et les céramides. Cela peut conduire à une résistance à l'insuline en altérant la fluidité membranaire (et donc perturber la fonction des récepteurs) et en activant des voies de signalisation conduisant par exemple à l'augmentation de la phosphorylation d'IRS-1 en position sérine (Cawthorn et Sethi, 2008).

Métabolisme cellulaire : Dans le tissu adipeux, TNF-α stimule la lipolyse, inhibe l'entrée d'acides gras dans les cellules et la lipogenèse (Cawthorn et Sethi, 2008). TNF-α stimule également la sécrétion de

leptine par le tissu adipeux (Kirchgessner *et al.*, 1997; Finck et Johnson, 2000; Landman *et al.*, 2003). La leptine a également un rôle dans la stimulation de la production des molécules d'adhésion des cellules endothéliales et donc dans la transmigration des monocytes vers le tissu adipeux (Fantuzzi, 2005).

Stress oxydatif et dysfonctionnement des organites : Dans le tissu adipeux et dans le foie, TNF-α stimule l'expression de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le stress oxydatif ou les réponses au stress du réticulum endoplasmique (RE). De plus, TNF-α inhibe l'expression de gènes impliqués dans la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie, ce qui peut induire des dysfonctions mitochondriales et la génération d'espèces réactives de l'oxygènes (ROS) (Adamson et Billings, 1992; Ruan *et al.*, 2002; Dahlman *et al.*, 2006; Cawthorn et Sethi, 2008). TNF-α inhibe également la β-oxydation des acides gras *in vitro* chez l'homme. La production de ROS contribue à potentialiser l'action de TNF-α *via* ses actions sur la phosphorylation d'IRS-1 et sur la modulation de l'expression des gènes des tissus cibles (Gloire *et al.*, 2006; Houstis *et al.*, 2006; Storer *et al.*, 2007). De plus, le stress RE, caractérisé par une incapacité du RE à replier correctement les protéines et à une surcharge des protéines chaperonnes, conduit à une altération de la voie de signalisation de l'insuline et donc à la diminution de la sensibilité à l'insuline (Nakatani *et al.*, 2005).

2.3.3.2. IL-6

L'action d'IL-6 sur le métabolisme énergétique est soumise à controverse.

IL-6 entraine une diminution de l'expression d'*IRS-1* et de *GLUT4 via PPARγ* dans le tissu adipeux et le foie (Senn *et al.*, 2002; Klover *et al.*, 2003; Rotter *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2005). IL-6 inhibe également la capacité de l'insuline à diminuer la production de glucose hépatique (Kim *et al.*, 2004). Dans le muscle, IL-6 inhibe l'activité IRS-1/PI3K, augmente les concentrations en acyl-coA (impliqués également dans les voies de signalisation conduisant à la phosphorylation sérine d'IRS-1) et augmente la phosphorylation en position sérine d'IRS-1 (de Alvaro *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Weigert *et al.*, 2006).

Cependant, dans le muscle, IL-6 est fortement produite pendant et après l'effort physique et aurait également un rôle dans l'adaptation et la capacité musculaire à l'exercice. Elle augmenterait la production de glucose hépatique et d'acides gras par le tissu adipeux pendant l'exercice (Mera *et al.*, 2016)

2.3.3.3. Action sur le pancréas

TNF-α et IL-1 inhibent la sécrétion pancréatique d'insuline médiée par le glucose et stimulent l'apoptose des cellules β *in vitro* (Pukel *et al.*, 1988; Zhang et Kim, 1995; Ortis *et al.*, 2009).

2.3.4. Action sur la croissance osseuse

IL-1 et TNF-α inhibent la production d'ostéocalcine par les ostéoblastes *in vitro* et *in vivo,* notamment en inhibant la fonction du promoteur de l'ostéocalcine (Li et Stashenko, 1992; Taichman et Hauschka, 1992; Kuroki *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 2000).

In vitro, il a été montré chez la souris et le rat qu'IL-6 et TNF-α inhibent la différenciation des pré-ostéoblastes (Frost *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 2000; Kaneshiro *et al.*, 2014; Hughes *et al.*, 2017) ainsi que la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses en ostéoblastes (Zhao *et al.*, 2011).

De plus, TNF-α joue un rôle dans la différenciation des cellules de la moelle osseuse en ostéoclastes et donc dans la résorption osseuse (Parameswaran et Patial, 2010).

Les cytokines pro-inflammatoires seules ont donc une action inhibitrice de la croissance osseuse.

2.3.5. Cytokines pro-inflammatoires, obésité et espèce équine

La relation entre obésité, résistance à l'insuline et cytokines pro-inflammatoires est controversée chez le cheval.

Il a été montré que le pourcentage de gras mesuré à la croupe (Westervelt *et al.*, 1976; Kane *et al.*, 1987) est positivement corrélé avec l'expression sanguine d'*IL-1* et de *TNF-α* ainsi qu'avec la concentration sérique de TNF-α (Vick *et al.*, 2007). De plus, la sensibilité à l'insuline mesurée par clamp hyperinsulinémique euglycémique est inversement corrélée avec l'expression sanguine de *TNF-α* et sa concentration sérique (Vick *et al.*, 2007). Ces résultats sont en accord avec le fait que la stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires par injection de lipopolysaccharides entraîne une diminution de la sensibilité à l'insuline le jour suivant chez des juments de selle adultes (Vick *et al.*, 2008). De plus, les chevaux âgés gras (NE moyenne = 3,9/5) ont plus de lymphocytes et de monocytes positifs au TNF-α que les chevaux âgés normaux (NE moyenne = 2,35/5) (Adams *et al.*, 2009). L'activité d'explosion oxydative (production rapide de ROS) des neutrophiles, qui conduit à une augmentation des ROS dans ces cellules, est augmentée chez les chevaux obèses hyperinsulinémiques (Holbrook *et al.*, 2012). Enfin, la concentration plasmatique de SAA est positivement corrélée à la note d'état, ce qui n'est cependant pas le cas pour TNF-α, IL-6 et IL-1 chez des chevaux adultes (Suagee *et al.*, 2013). De plus, la prise de poids accompagnée d'une diminution de la sensibilité à l'insuline suite à une surnutrition entraine une augmentation de la concentration plasmatique en SAA mais pas de modification de la concentration plasmatique en TNF-α (Bamford *et al.*, 2016).

Pour une même note d'état, les juments de selle résistantes à l'insuline (Sensibilité à l'insuline (SI) <1, mesuré par FSIVGTT) présentent les mêmes expressions en *TNF-α*, *IL-1* et *IL-6* dans tous les différents tissus adipeux que les juments de selle non résistantes à l'insuline (SI>1) (Burns *et al.*, 2010). De plus,

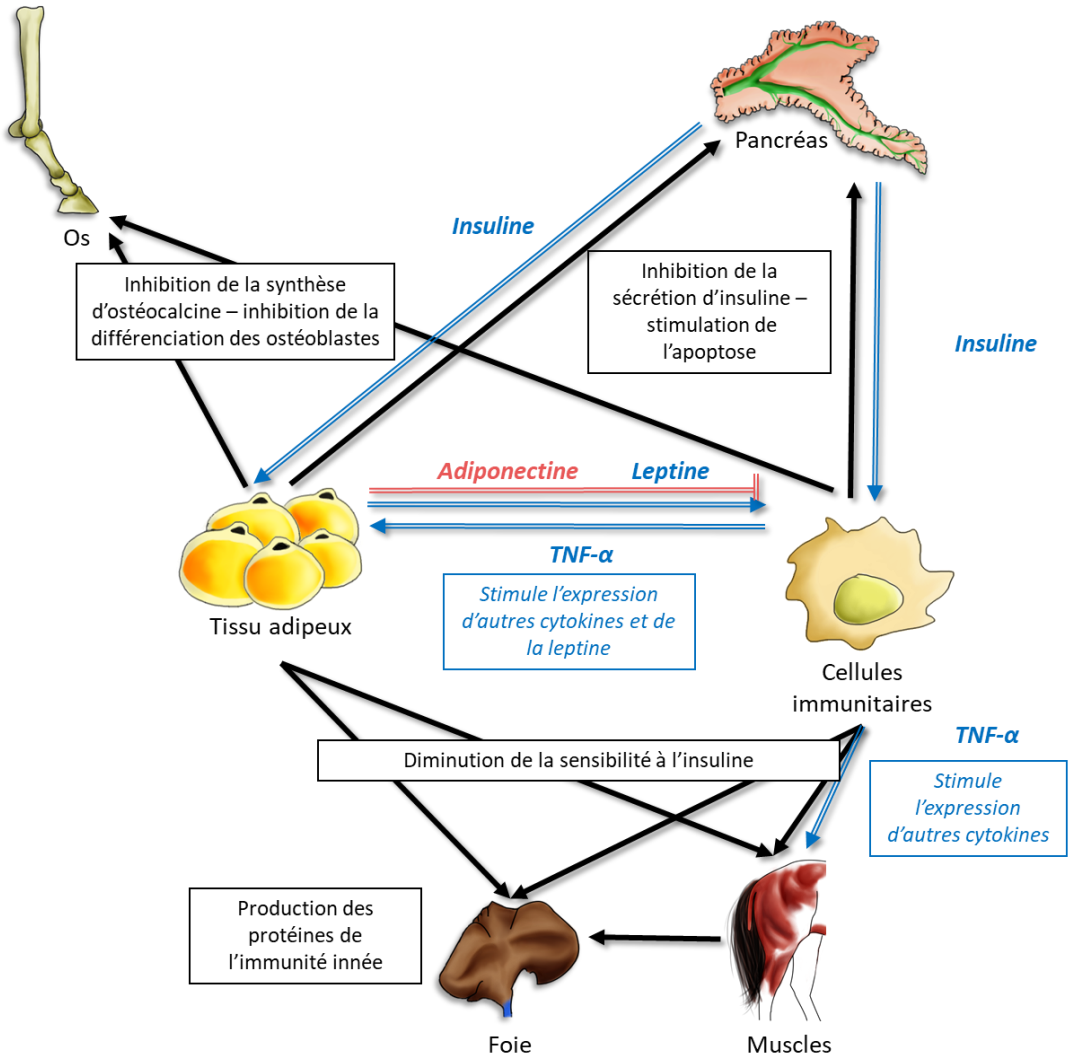


Figure A.20. Stimulation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux et actions systémiques de ces cytokines

La sécrétion des cytokines par les cellules immunitaires, le tissu adipeux et le muscle est régulée par l'insuline et les cytokines pro-inflammatoires produites par les autres tissus. Les cytokines pro-inflammatoire diminuent la sensibilité à l'insuline des tissus cibles, altèrent la fonction pancréatique ainsi que la croissance osseuse. Elles stimulent également la production de cytokines pro-inflammatoires par les autres tissus dans une boucle de stimulation.

Les flèches doublées correspondent aux facteurs qui stimulent ou inhibent la sécrétion de cytokines : en bleu, les facteurs qui stimulent la sécrétion de cytokines, en rose, les facteurs qui inhibent la sécrétion de cytokines. Les flèches pleines et noires correspondent à l'action des cytokines dans les différents tissus.

chez des chevaux obèses présentant un syndrome métabolique équin, la concentration en TNF-α a tendance à être moins élevée que chez des chevaux plus minces et sains. L'expression endogène par les cellules immunitaires sanguines d'IL-1 et d'IL-6 est également diminuée chez les chevaux hyperinsulinémiques (Holbrook *et al.*, 2012).

Les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les protéines de l'immunité innée produites par les cellules immunitaires, le tissu adipeux, le foie et les muscles diminuent la sensibilité à l'insuline, altèrent le développement des adipocytes et inhibent la croissance osseuse (Figure A.20). Ainsi dans le cadre de l'obésité, les cytokines pro-inflammatoires participent à la mise en place de la résistance à l'insuline et de l'avancée vers un diabète de type II.

2.4. Métabolisme osseux

2.4.1. Les différents types cellulaires

L'os est composé de différents types cellulaires (Figure A .21). Les **ostéoclastes** sont des cellules polynucléées qui proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et de la fusion des progéniteurs de la famille des monocytes/macrophages sous le contrôle de Rankl (Teitelbaum et Ross, 2003; Zaidi, 2007; Takahashi *et al.*, 2011; Kular *et al.*, 2012). Le rôle des ostéoclastes est de résorber la matrice osseuse en sécrétant des ions, des metalloprotéases et des enzymes collagenolytiques (Raggatt et Partridge, 2010). Par la suite, par signaux chimiotactiques, les cellules stromales mésenchymateuses sont recrutées (Tang *et al.*, 2009; Kular *et al.*, 2012) puis se différencient en pré-ostéoblastes puis en **ostéoblastes** matures *via* notamment l'action des protéines Wnt, Hedgehog, Notch, BMP et Fibroblast Growth Factor (FGF) (Harada et Rodan, 2003; Lin et Hankenson, 2011). Les ostéoblastes sont des cellules polarisées (membrane basolatérale à l'opposé de la surface osseuse) qui sécrètent une matrice organique composée de collagène de type I, ainsi que des protéines extracellulaires telles que l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline qui permet la formation de cristaux proches de l'hydroxyapatite (Pritchard, 1952; Hadjidakis et Androulakis, 2006; Rey *et al.*, 2010). Les pré-ostéoblastes produisent la protéine rankl qui stimule la différenciation des cellules précurseurs en ostéoclastes, ils perdent cette capacité lorsqu'ils se différencient en ostéoblastes matures (Atkins *et al.*, 2003; Fumoto *et al.*, 2014). Après la fin de la minéralisation, un grand nombre d'ostéoblastes entre en apoptose et certains se retrouvent piégés dans la matrice minéralisée où ils se différencient en **ostéocytes** (Dallas *et al.*, 2013). Les ostéocytes produisent de la sclerostine qui est un inhibiteur des protéines Wnt et donc de la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes et rankl qui stimule la différenciation des cellules précurseurs en ostéoclastes (van Bezooijen *et al.*, 2004; Dallas *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2015).

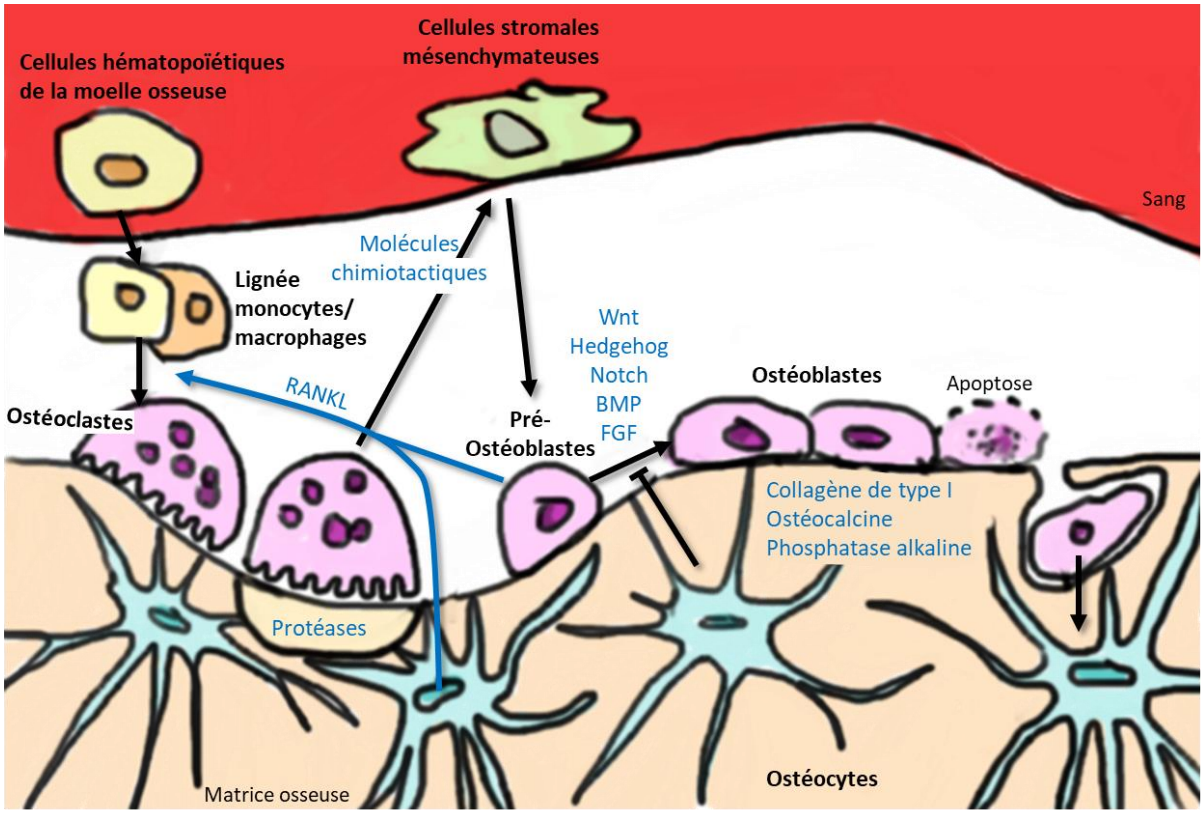


Figure A.21. Organisation de l'os et différents types cellulaires

Les ostéoclastes sécrètent des protéases, des ions et des enzymes collagenolytiques afin de résorber la matrice osseuse. Ils dérivent de la fusion de cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse de lignée monocytes/macrophages sous le contrôle de RANKL. Durant la résorption osseuse, les ostéoclastes synthétisent des molécules chimiotactiques qui recrutent les cellules stromales mésenchymateuses qui se différencient et les pré-ostéoblastes qui expriment RANKL puis en ostéoblastes sous le contrôle de Wnt, Hedgehog, Notch, BMP et FGF. Les ostéoblastes synthétisent la matrice osseuse en sécrétant du collagène de type I, de l'ostéocalcine et de la phosphatase alcaline. A la fin de la minéralisation, les ostéoblastes rentrent en apoptose ou restent piégés dans la matrice et se différencient en ostéocytes. Les ostéocytes expriment RANKL et sécrètent la sclerostine, qui inhibe Wnt.

2.4.2. Croissance des os longs et ossification enchondrale

Durant la vie fœtale, le modèle cartilagineux des futurs os longs est formé par condensation et différentiation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes (Figure A.22). Le modèle cartilagineux s'agrandit par prolifération des chondrocytes. L'ossification du modèle cartilagineux est précédée d'une hypertrophie des chondrocytes au centre de l'os ainsi que par le dépôt d'un « collet osseux » par des ostéoblastes au même endroit. Par la suite, les vaisseaux sanguins, les ostéoclastes, la moelle osseuse ainsi que les précurseurs d'ostéoblastes envahissent le modèle cartilagineux depuis le collier osseux et forment les centres primaires d'ossification. Un second centre d'ossification se forme par la suite à chaque extrémité du modèle cartilagineux (van Weeren, 2006; Mackie *et al.*, 2011).
Ainsi, à la naissance, deux régions spécialisées dans la croissance cartilagineuse sont présentes aux extrémités des os longs (Figure A.23) :
La **plaque de croissance** est présente de chaque côté du centre primaire d'ossification et est responsable de la croissance longitudinale (Byers et Brown, 2006; van Weeren, 2006; Ytrehus *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2011). Le **cartilage epiphysaire** est présent entre les centres secondaires d'ossification et le cartilage articulaire par lequel il est recouvert. Il est responsable de la forme des extrémités des os longs (Byers et Brown, 2006; van Weeren, 2006; Ytrehus *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2011). Le cartilage de croissance est remplacé par l'os au travers d'un processus séquentiel appelé « **ossification enchondrale** » (van Weeren, 2006; Ytrehus *et al.*, 2007).

Les cartilages de croissance sont organisés en quatre zones différentes (Figure A.22). La **zone de repos** contient des chondrocytes peu actifs, précurseurs de la **zone de prolifération** dans laquelle les cellules, très actives, se divisent rapidement. Dans le cartilage de croissance, les chondrocytes forment des colonnes tandis que dans le cartilage epiphysaire, les cellules forment des clusters plutôt que des colonnes (Byers et Brown, 2006; Ytrehus *et al.*, 2007). Dans la **zone hypertrophique**, les chondrocytes hypertrophiques secrètent une matrice très spécialisée qui promeut la calcification du cartilage et sert de support à la formation de l'os par les ostéoblastes (Ytrehus *et al.*, 2007). Ces chondrocytes produisent des vésicules contenant une combinaison de protéines parmi lesquelles des transporteurs de phosphate et des phosphatases qui contribuent à la minéralisation du cartilage ainsi que des annexines qui auraient un rôle essentiel dans le dépôt du calcium dans les vésicules (Mackie *et al.*, 2011). En effet, l'os est composé de cristaux d'hydroxyapatite eux-mêmes composés principalement de calcium et de phosphate. Par la suite, dans la **zone de calcification** et particulièrement la zone de minéralisation, les chondrocytes hypertrophiques entrent en mort cellulaire non apoptotique (Mackie *et al.*, 2011). Des metalloprotéases produites par les chondrocytes eux-mêmes et par les ostéoclastes dégradent alors les parois transverses laissées après cette mort programmée, ce qui permet, dans les

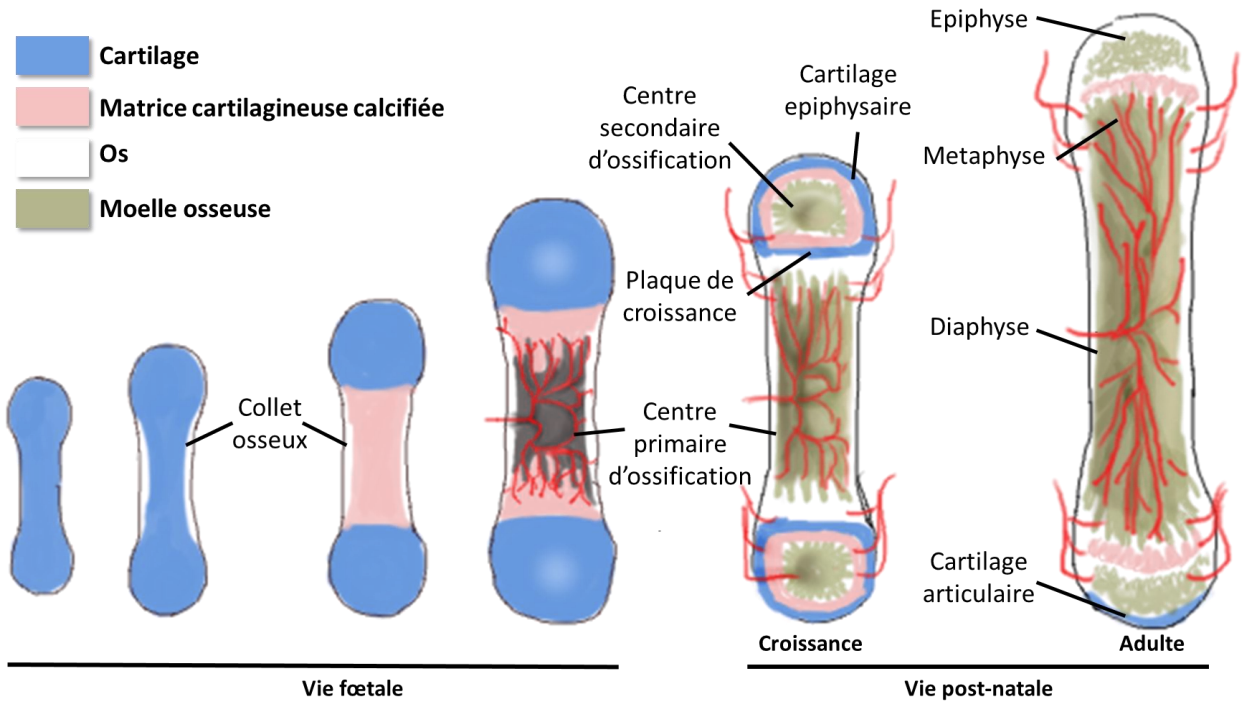


Figure A.22. Développement osseux par ossification enchondrale
Durant la vie fœtale, un collet osseux se développe au centre de l'os, puis le centre primaire d'ossification se développe par vascularisation, infiltration des progeniteurs et de la moelle osseuse. A la naissance, le poulain possède un centre primaire et deux centres secondaires d'ossification où vont se dérouler la croissance osseuse par transformation du cartilage en os au niveau des plaques de croissance. L'os est considéré mature lorsque les centres primaires et secondaires se rejoignent et la plaque de croissance se soude. *D'après Mackie et al., (2011) et van Weeren (2006)*.

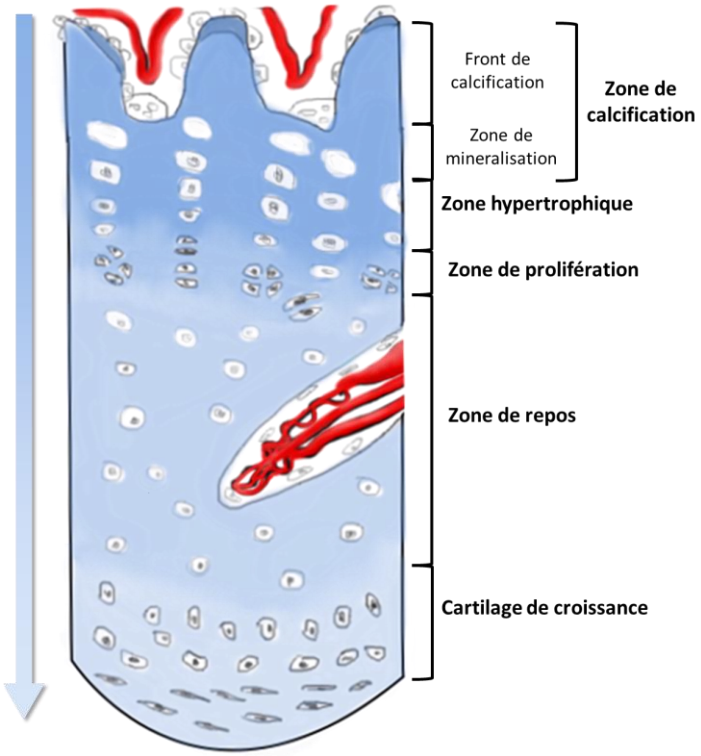


Figure A.23. Coupe transversale schématique du cartilage epiphysaire
Les chondrocytes peu actifs de la zone de repos se divisent en zone de prolifération puis deviennent hypertrophiques en zone hypertrophique dans laquelle ils participent à la formation de la matrice cartilagineuse calcifiée, remaniée par les metalloprotéases suite à la mort programmée des chondrocytes. Ces remaniements permettent la vascularisation du front de calcification et le recrutement des ostéoblastes qui vont déposer la matrice osseuse. L'os s'allonge donc dans la direction de la flèche. *D'après Ytrehus et al., (2007) et Mackie et al., (2011).*

lacunes laissées vacantes, l'invasion des vaisseaux sanguins et des cellules ostéoprogénitrices (Ytrehus *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2011). Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) produit par les chondrocytes semble être le facteur responsable et nécessaire de la croissance vasculaire de la plaque de croissance (Ytrehus *et al.*, 2007). Sur le front d'ossification, les ostéoblastes déposent la matrice osseuse entre les parois verticales, qui n'ont pas été dégradées par les ostéoclastes (Ytrehus *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2011).

La croissance du front d'ossification est plus rapide que celle du cartilage (Ytrehus *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2011). Ainsi, au cours de la croissance, le cartilage devient de plus en plus fin. Le squelette est considéré mature lorsque la plaque de croissance disparait, au moment où les centres primaires et secondaires d'ossification se rejoignent et fusionnent (Mackie *et al.*, 2011). Chez l'homme, il a été montré que les œstrogènes régulaient ce processus. La fermeture de la plaque de croissance adviendrait lorsque les chondrocytes ont épuisé leur potentiel prolifératif. Le rôle des œstrogènes serait alors d'accélérer ce processus de senescence (Mackie *et al.*, 2011).

2.4.3. Hormones stimulant la croissance osseuse

2.4.3.1. Hormone de croissance et IGF-1

Lors de l'ossification endochondrale, l'hormone de croissance stimule la croissance des os longs par action locale (Isaksson *et al.*, 1982) en stimulant la production locale d'IGF-1 (Isaksson *et al.*, 1982; Schlechter *et al.*, 1986; Isgaard *et al.*, 1988; Ohlsson *et al.*, 1992), mais également en induisant directement la prolifération des chondrocytes de la zone de repos (Ohlsson *et al.*, 1992) et une action *via* la stimulation de la production d'IGF-1 par le foie (Daughaday *et al.*, 1972; Sims *et al.*, 2000; Butler et LeRoith, 2001; Yakar *et al.*, 2002).

2.4.3.2. Hormones thyroïdes

L'hormone triiodothyronine (T3) stimule la différenciation et inhibe la prolifération des chondrocytes et stimule la différenciation des ostéoblastes et donc la formation osseuse. La thyréostimuline (TSH), sécrétée par l'hypophyse, inhibe quant à elle la différenciation et la fonction des ostéoclastes (Duncan Bassett et Williams, 2016).

2.4.3.3. Œstrogènes et androgènes

Durant la croissance, les œstrogènes jouent un rôle dans la fusion des plaques epiphysaires. A basse dose (avant la puberté), ils agissent *via* la stimulation de la sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse et la production d'IGF-1 par le foie (Almeida *et al.*, 2017). A haute dose, ils stimulent la

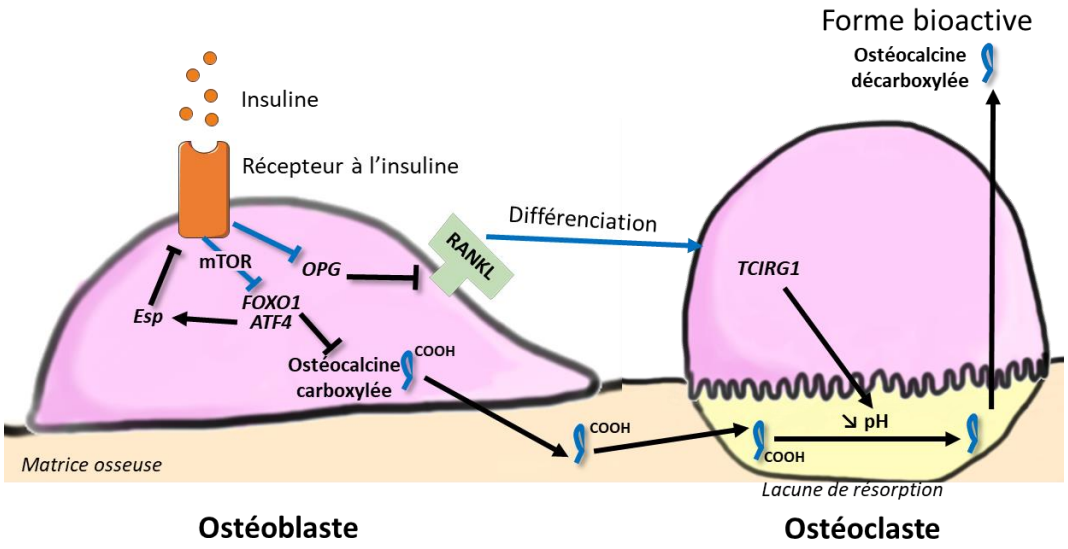


Figure A.24. Action de l'insuline sur la sécrétion d'ostéocalcine bioactive
L'action du récepteur à l'insuline dans les ostéoblastes passe par l'inactivation du facteur de transcription forkhead box O 1 (FOXO1) et donc la stimulation de l'expression du gène de l'ostéocalcine et l'inhibition de l'activating transcription factor 4 (ATf4) qui conduit à l'inhibition du gène Esp qui code pour la synthèse de l'ostéoarticular protein tyrosine phosphatase (OST-PTP) qui déphosphoryle le récepteur à l'insuline. Ces modulations d'expression passeraient via la voie mammalian target of rapamycin (mTOR).
L'insuline induit également la diminution de l'expression de l'ostéoprotegerine (OPG), un inhibiteur du receptor activator of NFκB ligand (RANKL) dans les ostéoblastes et donc stimule la différenciation des ostéoclastes. L'insuline induit également la stimulation de l'expression ostéoclastique du gène T-cell immune regulator 1 (TCIRG1), qui entraine l'acidification de la matrice osseuse dans la lacune de résorption et donc l'activation de l'ostéocalcine.
(Ferron et al., 2010). *D'après Ferron et al., 2010, Kode et al., 2012, Yoshizawa et al., 2009 et Riddle et al., 2014.*

fermeture de la plaque de croissance et donc l'arrêt de la croissance en agissant directement sur les récepteurs à œstrogènes présents sur les chondrocytes (Almeida *et al.*, 2017).

Durant la vie adulte, les œstrogènes agissent sur les ostéoblastes en inhibant leur apoptose et leur stress oxydatif, stimulent l'apoptose et inhibent la différenciation des ostéoclastes *via* rankl et diminuent l'apoptose des ostéocytes (Oury, 2012; Galea *et al.*, 2013; Cauley, 2015; Martin *et al.*, 2017).

Il est possible que l'action des androgènes sur la croissance osseuse passe en grande partie par leur aromatisation en œstrogènes (Purohit *et al.*, 1992; Öz *et al.*, 2001). Cependant, l'action directe des androgènes semble stimuler la prolifération des chondrocytes en stimulant la production locale d'IGF-1, inhiber l'apoptose des ostéoblastes en inhibant la sécrétion d'IL-6, stimuler la prolifération et la différenciation des ostéoblastes en augmentant l'expression de transforming growth factor beta (TGFβ), fibroblast growth factor (FGF) et (insulin-like-growth factor 2) IGF-2 et diminuer le nombre d'ostéoclastes en inhibant leur différenciation *via* rankl (Maor *et al.*, 1999; Krohn *et al.*, 2003; Oury, 2012; Cauley, 2015; Martin *et al.*, 2017).

2.4.4. L'ostéocalcine

2.4.4.1. Synthèse

L'ostéocalcine subit une modification post-traductionnelle de carboxylation (Hauschka *et al.*, 1989). Cette carboxylation lui confère une affinité élevée pour les ions minéraux. De plus, les ostéoclastes en acidifiant le milieu lors de la résorption osseuse, entrainent une décarboxylation de l'ostéocalcine contenue dans la matrice osseuse (Engelke *et al.*, 1991; Ferron *et al.*, 2010a).

Comme présenté en parties *2.1.3.2.5.*, *2.2.1.5.2.*, *2.2.2.6.2.*, et **2.3.4.**, la synthèse d'ostéocalcine par les ostéoblastes est stimulée par l'insuline et la leptine et inhibée par l'adiponectine et certaines cytokines pro-inflammatoires. Comme présenté en partie **2.3.4**., bien qu'inhibant sa synthèse par les ostéoblastes, l'IL-6 stimulerait la libération de l'ostéocalcine bioactive.

L'action du récepteur à l'insuline dans les ostéoblastes passerait par (Figure A.24) :

- L'inactivation du facteur de transcription FoxO1 qui inhibe l'expression du gène de l'ostéocalcine (Ferron *et al.*, 2010a) et qui agit en collaboration avec ATf4 (Kode *et al.*, 2012) qui stimule l'expression du gène *Esp* qui code l'OST-PTP qui déphosphoryle le récepteur à l'insuline et donc inhibe son action cellulaire (Yoshizawa *et al.*, 2009).
- Ces modulations d'expression passeraient *via* la voie mTOR (Riddle *et al.*, 2014).
- La diminution de l'expression de l'*ostéoprotegerine (OPG)*, un inhibiteur de rankl dans les ostéoblastes (Ferron *et al.*, 2010a).

- La stimulation de l'expression ostéoclastique de *TCIRG1*, qui code pour une sous-unité d'une pompe à proton essentielle pour l'acidification de la matrice osseuse et donc la résorption osseuse qui conduit à la décarboxylation de l'ostéocalcine de la matrice osseuse et donc à son activation (Ferron *et al.*, 2010a).

2.4.4.2. Action sur l'os

Les ostéoblastes mais également, dans une moindre mesure, les chondrocytes hypertrophiques, sécrètent de l'ostéocalcine (Hauschka *et al.*, 1989; Zoch *et al.*, 2016). Le rôle principal de cette hormone serait de former un pont entre la matrice organique (elle se lie à l'ostéopontine) et la fraction minérale (cristaux d'hydroxyapatite) du tissu osseux et ainsi améliorer la capacité de l'os à subir des tensions élevées sans se briser (Hauschka et Carr, 1982; Hoang *et al.*, 2003; Poundarik *et al.*, 2012; Nikel *et al.*, 2013).

2.4.4.3. Action sur le métabolisme énergétique

L'ostéocalcine ne serait active sur les tissus cibles que sous une forme non carboxylée (Lee *et al.*, 2007). L'action de l'ostéocalcine passerait via le récepteur GPR6A, couplé à une protéine G, exprimé dans les ostéoblastes, les cellules β-pancréatiques, le muscle squelettique, le tissu adipeux, le foie et les cellules de Leydig (Pi *et al.*, 2010, 2011; Oury *et al.*, 2011; Karsenty et Oury, 2014; Du *et al.*, 2016; Mera *et al.*, 2016).

2.4.4.4. Action sur la sensibilité à l'insuline

In vitro et *in vivo*, l'ostéocalcine stimule l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux blanc (Lee *et al.*, 2007; Ferron *et al.*, 2008). *In vivo* chez la souris, l'ostéocalcine stimule la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux, les muscles et le foie, diminue la masse grasse et augmente la dépense énergétique globale (Lee *et al.*, 2007; Ferron *et al.*, 2008, 2010a, 2012; Karsenty, 2011a). Elle améliore également les paramètres métaboliques suite à une obésité et un diabète induits par surnutrition (Ferron *et al.*, 2008, 2012).

Dans le muscle, l'action de l'ostéocalcine permettrait une meilleure capacité musculaire à l'exercice *via* notamment la synthèse d'IL-6 et de son récepteur (Mera *et al.*, 2016).

De plus, chez l'homme, la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose sont associés avec une concentration sérique basse d'ostéocalcine (Hwang *et al.*, 2009, 2012; Kindblom *et al.*, 2009; Reinehr et Roth, 2010; Yeap *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014).

L'ostéocalcine améliorerait la sensibilité à l'insuline en :

- Stimulant l'expression de l'adiponectine par le tissu adipeux *via* la stimulation de l'expression de *PPARγ* (Ferron *et al.*, 2008; Yoshikawa *et al.*, 2011) mais pas l'expression de leptine (Yoshikawa *et al.*, 2011).
- Stimulant de l'expression de *Mcad* dans le muscle, qui est un marqueur de la sensibilité à l'insuline musculaire (Ferron *et al.*, 2008).
- Diminuant le stress du réticulum endoplasmique *via* la voie NF-κB (Zhou *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2017).

2.4.4.5. Action sur la production d'insuline

L'action de l'ostéocalcine sur la production d'insuline a été traitée en partie *2.1.2.3.4.*

In vitro, l'ostéocalcine augmente l'expression de l'insuline et des marqueurs de prolifération en culture primaire de cellules β-pancréatiques (Lee *et al.*, 2007; Ferron *et al.*, 2008). *In vivo*, l'ostéocalcine augmente la concentration sérique d'insuline et diminue la glycémie basale, augmente la masse et la surface des cellules β-pancréatiques ainsi que le contenu en insuline de ces cellules (Ducy *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007; Ferron *et al.*, 2008, 2010a; Hinoi *et al.*, 2009). Une de ces actions passerait par la simulation de la production d'incrétines telles que GLP-1 (Mizokami *et al.*, 2013, 2014).

2.4.4.6. Action sur la fonction de reproduction

Il a été également montré que l'ostéocalcine stimule la sécrétion de testostérone chez l'homme et la souris *in vivo* et *in vitro* et joue un rôle dans la maturation des cellules de Leydig (Lee *et al.*, 2007; Karsenty, 2011a; Oury *et al.*, 2011; Karsenty et Oury, 2014). L'ostéocalcine stimule *via* la voie AMPc l'expression du facteur de transcription *cAMP response element binding (CREB)* qui stimule l'expression *de stAR* (transport du cholestérol dans la mitochondrie)*, Cyp11* (enzyme P450scc qui catalyse la conversion du cholestérol en pregnenolone)*, 3β-HSD* et *Cyp 17* (2 enzymes qui catalysent la conversion de la pregnenolone en testosterone) qui participent à la synthèse de la testostérone (Oury *et al.*, 2011; Oury, 2012). Cependant, l'ostéocalcine ne semble pas avoir d'effet sur la fonction ovarienne (Oury *et al.*, 2011).

De plus, chez les humains la puberté est associée avec une augmentation de la concentration sérique en ostéocalcine (Kirmani *et al.*, 2011).

2.4.4.7. L'ostéocalcine au sein de l'espèce équine

Chez le cheval, la concentration sérique et plasmatique d'ostéocalcine diminue avec l'âge en accord avec la diminution du métabolisme osseux après la fin de la croissance (Lepage *et al.*, 1990, 1992; Davicco *et al.*, 1994; Donabédian *et al.*, 2008) et est corrélée avec la hauteur au garrot à 1 an

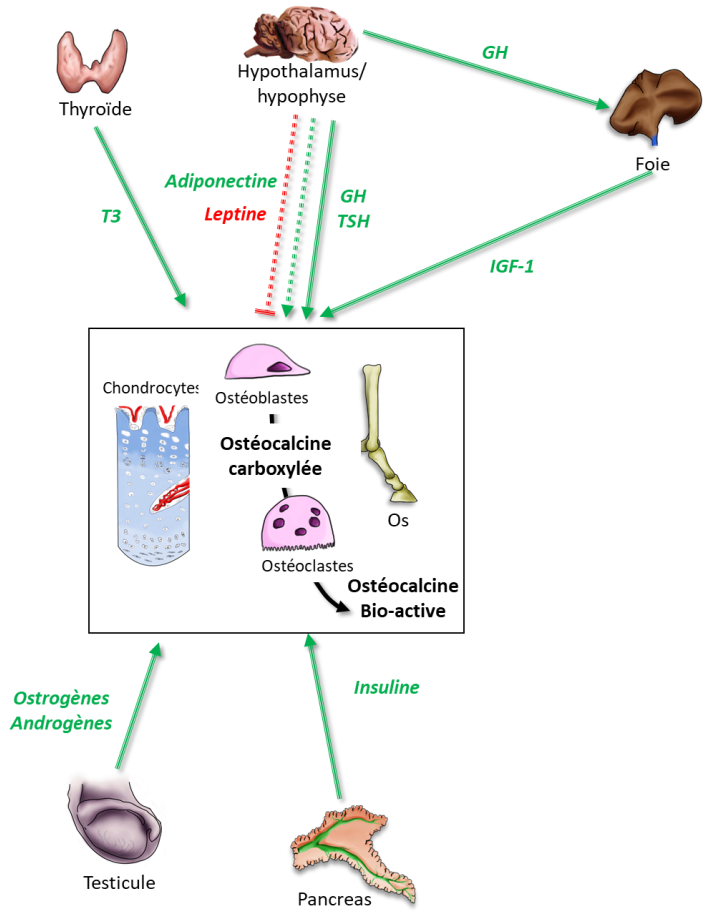


Figure A.25. Facteurs hormonaux régulant la croissance et le remodelage osseux
Les flèches vertes correspondent aux facteurs qui stimulent la croissance et le remodelage osseux, les flèches rouges aux facteurs qui les inhibent.

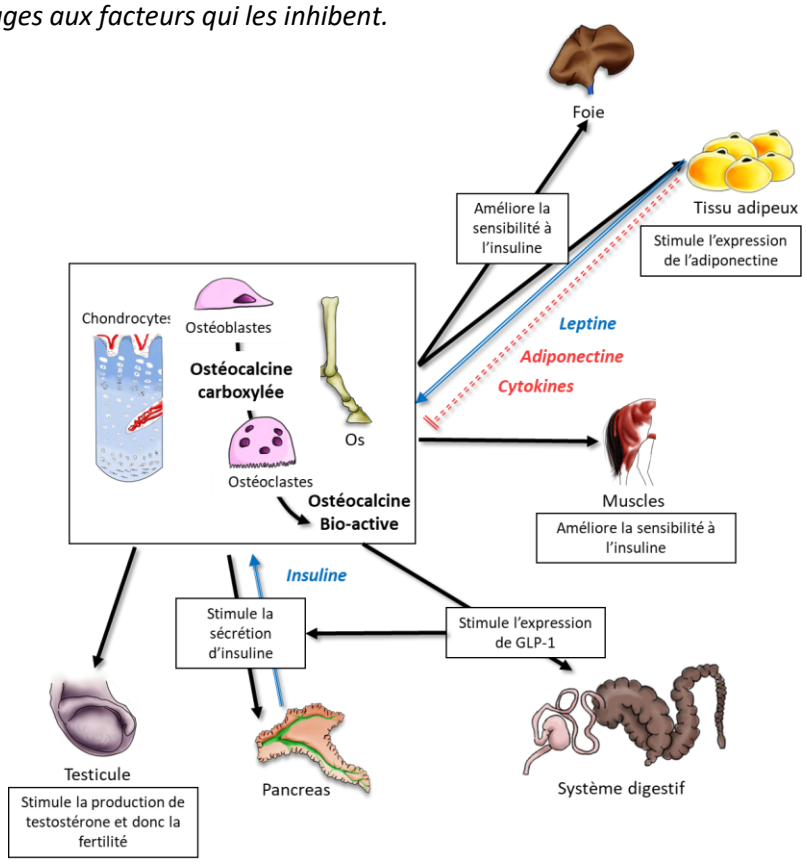


Figure A.26. Synthèse et action de l'ostéocalcine sur les fonctions métaboliques et de reproduction
L'ostéocalcine améliore la sensibilité à l'insuline du foie, du tissu adipeux et du muscle, stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas et stimule la fonction de reproduction masculine.
Les flèches doublées correspondent aux facteurs qui stimulent ou inhibent la sécrétion de l'ostéocalcine : en bleu, les facteurs qui stimulent la sécrétion de l'ostéocalcine, en rose, les facteurs qui inhibent la sécrétion de l'ostéocalcine. Les flèches pleines et noires correspondent à l'action de l'ostéocalcine dans les différents tissus.

(Donabédian *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que la concentration plasmatique d'ostéocalcine à 2 semaines était positivement corrélée avec le nombre de lésions d'ostéochondrose observés à 5,5 et 11 mois ainsi qu'avec le score de sévérité des lésions au niveau des articulations des membres à 1 an (Donabédian *et al.*, 2008). Le rôle de l'ostéocalcine sur le métabolisme équin n'a pas été étudié.

L'os en tant qu'organe endocrine améliore la sensibilité à l'insuline, stimule la production d'insuline par le pancréas ainsi que la fonction de reproduction masculine (Figures A.25 et A.26).

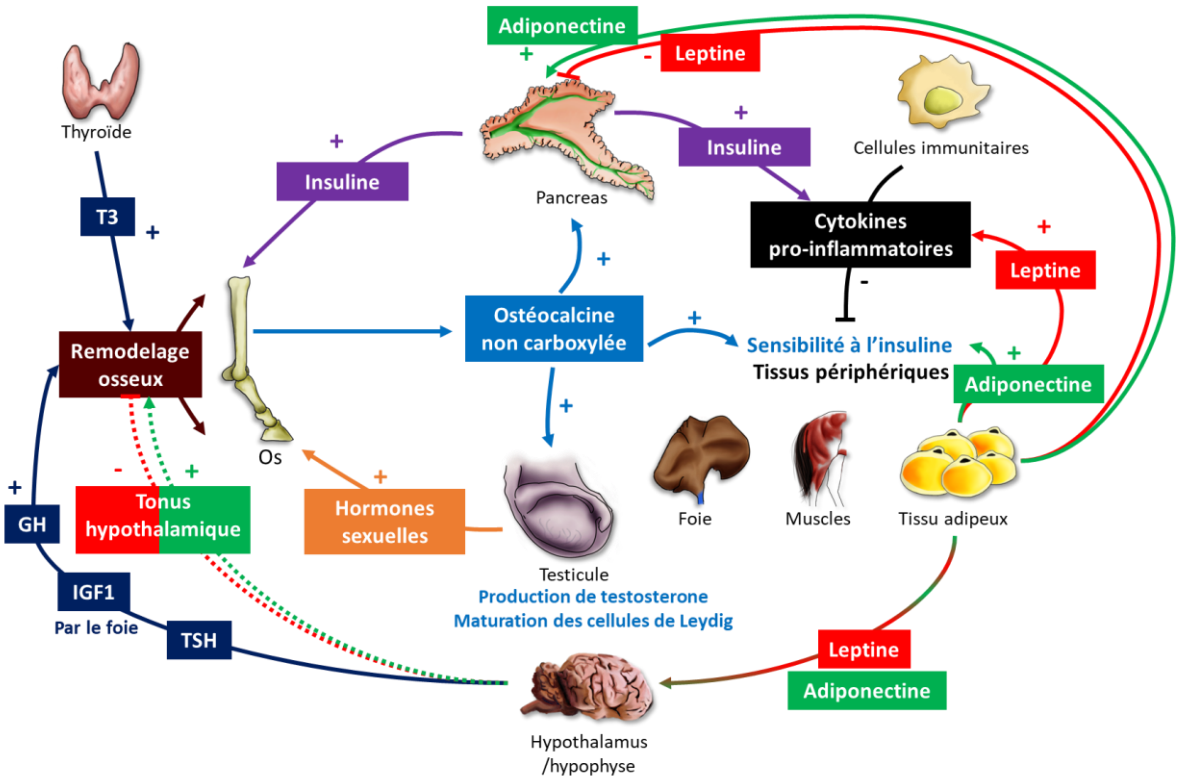


Figure A.27. Interactions des métabolismes glucidique, lipidique, osseux, gonadique et de l'inflammation systémique

Le fonctionnement du métabolisme énergétique est étroitement relié au fonctionnement du métabolisme osseux. L'insuline stimule le remodelage osseux et la synthèse d'ostéocalcine qui en retour stimule la production d'insuline par le pancréas. L'ostéocalcine stimule la sensibilité à l'insuline des tissus cibles en stimulant la synthèse d'adiponectine par le tissu adipeux. L'ostéocalcine stimule la synthèse de testostérone et la maturation des cellules de Leydig. Les hormones stéroïdes stimulent l'accrétion osseuse et régulent la croissance. Les adipokines régulent le métabolisme énergétique et osseux par voie endocrine, autocrine/paracrine et *via* le système nerveux sympathique suivant la disponibilité nutritionnelle et l'état métabolique de l'individu.

En résumé (Figure A.27)

Le métabolisme glucidique, le métabolisme lipidique, la croissance osseuse, la fonction de reproduction et l'inflammation systémique sont régulés par un grand nombre de facteurs nutritionnels et hormonaux qui peuvent agir *via* le système nerveux sympathique, au niveau endocrine mais également au niveau paracrine et autocrine de manière différente en fonction du contexte (maladie, statut nutritionnel, âge, sexe), du tissu, ainsi que des autres facteurs. L'ensemble de ces fonctions est en interaction. Ainsi, toute perturbation de l'un des acteurs affectera les autres.

3. Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD)

3.1. Historique et définition du concept

3.1.1. Hypothèse de Barker

Les prémisses des idées qui donneront par la suite le concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD) ont commencé à être formulées dès le début du XXème siècle (Kermack et al., 1934). Par la suite, sporadiquement jusque dans les années 1980, des études ont été réalisées chez l'homme et les rongeurs sur des aspects physiologiques et psychologiques et ont commencé à faire le lien entre l'environnement précoce, les altérations du développement des fonctions physiologiques à la naissance et l'augmentation de la mortalité et des pathologies à l'âge adulte (Forsdahl, 1977; De Prins and Van Assche, 1982). Le terme de « **programmation** » a été alors proposé, caractérisé comme le fait que « la stratégie de développement soit définie dès le début » (Dörner, 1975; Koletzko, 2005; Hanson et Gluckman, 2014).

A la fin des années 1980 et au début des années 1990, Barker et son équipe ont établi un lien de corrélation entre les faibles poids de naissance (inférieur à 2,5 kg) et le développement d'hypertension, de maladies cardiovasculaires, de crises cardiaques et de diabète de type II à l'âge adulte (Barker *et al.*, 1989).
Ainsi, le terme de programmation a été repris par Barker sous l'expression « **programmation fœtale** ». De même, ces travaux ont conduit à l'appellation de ce concept qui n'était encore qu'une hypothèse « **hypothèse de Barker** ».

3.1.2. Famine Hollandaise

Durant la seconde guerre mondiale, au cours de l'hiver 1944-1945, les Pays-Bas ont été touchés par une famine suite à un blocus Allemand. La particularité de cette famine est d'être apparue dans un pays qui auparavant était bien nourri et qui a de nouveau été bien nourri par la suite. L'apport calorique moyen des adultes était de 400kcal/jour contre des besoins allant jusqu'à 2500 kcal/jour pour une femme enceinte. Comme la famine dura le temps d'un hiver, *in utero,* les enfants furent exposés à la sous-nutrition en début, milieu ou fin de grossesse. Les individus exposés à la sous-nutrition *in utero* à la moitié et à la fin de la grossesse sont nés plus petits et suivant les périodes d'exposition, ont développé à l'âge adulte une diminution de la tolérance au glucose, plus de maladies cardio-vasculaires, d'obésité (composantes du syndrome métabolique) ainsi que de maladies d'obstruction

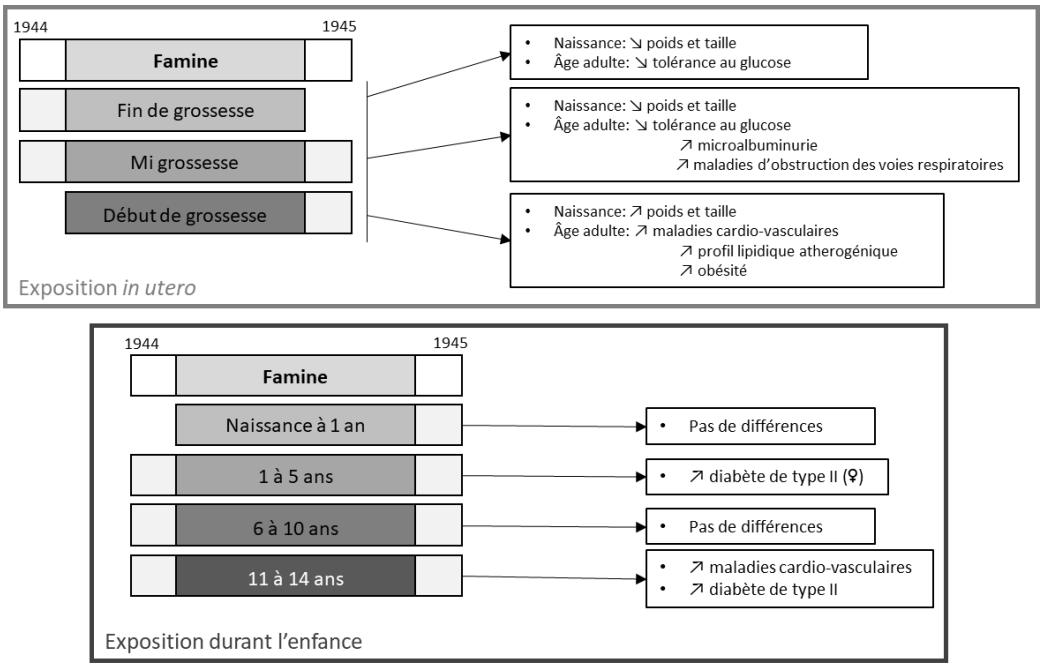


Figure A.28. Effets à long terme de l'exposition *in utero* ou post-natale à la « famine Hollandaise »

D'après Lumey et al., 1992 ; Roseboom et al., 2001a, 2001b ; Painter et al., 2005 ; Roseboom et al., 2006 ; Portrait et al., 2011

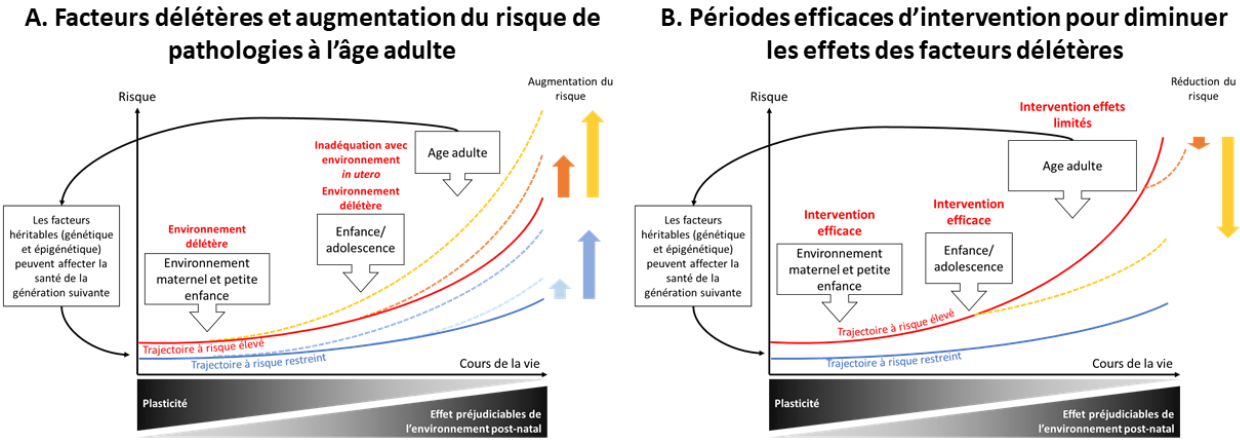


Figure A.29. Evolution de la plasticité au cours de la vie, effet d'un environnement délétère ou protecteur sur le risque de développer des pathologies à l'âge adulte

A. Les marques épigénétiques étant héritables, l'individu au moment de la conception va hériter de celles de ses parents. Ainsi dès la conception, certains individus auront des risques plus élevés que d'autres de développer des pathologies à l'âge adulte (trajectoire à risque élevé ou restreint). L'environnement précoce (*in utero* et post-natal jusqu'à la vie de jeune adulte) s'il est délétère (sous-nutrition par exemple) va pouvoir augmenter le risque pour l'individu de développer des pathologies à l'âge adulte, d'autant plus si l'environnement dans lequel il vit est en inadéquation avec l'environnement précoce.

B. La plasticité étant importante chez les jeunes individus, le risque de développer des pathologies à l'âge adulte pourra être modulé par son environnement précoce. Les interventions à l'âge adulte auront cependant des effets très limités.

D'après Hanson et Gluckman, 2014

des voies aériennes (Roseboom *et al.*, 2001a, b, 2006; Painter *et al.*, 2005). De plus, les individus ayant subi la famine durant leur enfance, en particulier les femmes, ont développé à l'âge adulte plus de diabète de type II et de maladies cardio-vasculaires (Portrait *et al.*, 2011). Les effets délétères observés à long terme de la sous-nutrition *in utero* ou post-natale étaient différents suivant la période durant laquelle l'enfant était exposé (Figure A.28). Cela implique l'existence de « **fenêtres de vulnérabilité** » ou « **périodes critiques** » qui s'étendent depuis la conception jusqu'à la vie de jeune adulte (McCance, 1976; Hanson et Gluckman, 2014). Ainsi, il serait possible d'intervenir à certains âges précoces de la vie afin de mitiger les effets délétères de l'exposition précoce à certains facteurs environnementaux (Figure A.29) (Hanson et Gluckman, 2014). De plus, les individus exposés à la sous-nutrition *in utero* (génération F1) ont par la suite donné naissance à des individus de plus petite taille à la naissance (génération F2) que les individus non exposés à la sous-nutrition *in utero* (Painter *et al.*, 2008a). Les modifications phénotypiques observées à la première génération sont donc capables d'altérer le phénotype de la génération suivante, en l'absence du facteur environnemental délétère. Cela signifie que l'exposition d'une génération à un environnement particulier pourrait s'étendre aux générations suivantes et ainsi moduler l'héritage phénotypique des caractères génétiques (Gluckman et Hanson, 2004a).

On parle donc désormais d'« **Origines Développementales de la Santé et des Maladies** » (ou « **DOHaD** » en anglais pour « **Developmental Origins of Health and Disease** »).

3.1.3. Réponse adaptative prédictive et « second hit »

Une explication « finaliste » a été proposée pour ce phénomène. En cas de conditions défavorables telles que la sous-nutrition maternelle, il y aurait mise en place d'adaptations physiologiques fœtales afin de privilégier la survie à court terme du fœtus, c'est la « **réponse adaptative immédiate** » (Hanson et Gluckman, 2014). Ces adaptations conduiraient au développement d'un « **phénotype économe** » ou « **thrifty phenotype** » dans le cas d'une exposition à un environnement précoce carencé (Hales et Barker, 1992; Hales *et al.*, 1997). Ce phénotype serait donc adapté à un environnement post-natal en adéquation avec l'environnement *in utero*, ce qui est défini par le terme « **réponse adaptative prédictive** » (Gluckman et Hanson, 2004a). Dans le cas où l'environnement post-natal serait en décalage avec l'environnement anténatal, l'individu serait incapable de répondre de façon adéquate à son environnement et le risque qu'il développe des pathologies serait ainsi augmenté, ce phénomène est désigné sous le terme de « **mismatch** » en anglais (Gluckman et Hanson, 2004b; Godfrey *et al.*, 2007; Hanson et Gluckman, 2014) (Figure A.30).

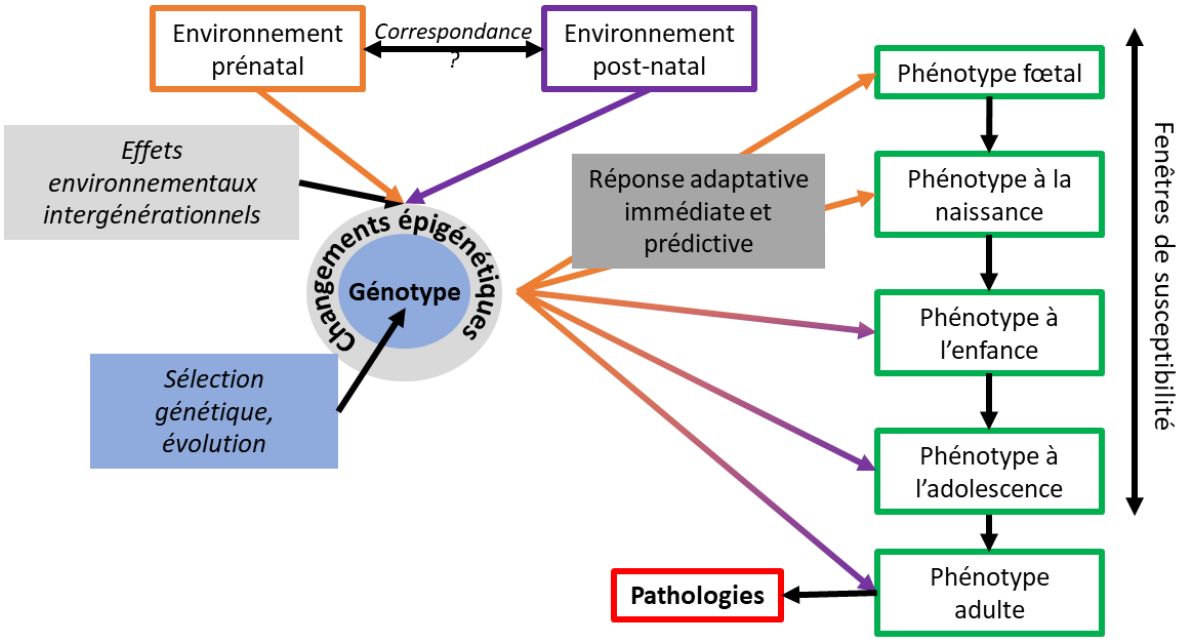


Figure A.30. Modèle représentant l'interaction des facteurs génétiques et environnementaux pré et post-natals impliqués dans le concept de la DOHaD

Le génotype d'un individu est conditionné par la sélection naturelle et/ou génétique. L'expression de ce patrimoine peut être modulée par des facteurs environnementaux *via* des changements épigénétiques. Ces marques épigénétiques peuvent être héritées (effets intergénérationnels) et/ou acquises, dépendant de l'environnement *in utero* et post-natal. Dans un environnement délétère, l'individu va subir des adaptations physiologiques privilégiant la survie à court terme (réponse adaptative immédiate). L'individu sera donc adapté à un environnement équivalent à son environnement précoce (réponse adaptative prédictive). Si cet environnement ne correspond pas à l'environnement précoce, l'individu sera plus à risque de développer des pathologies à l'âge adulte.

D'après Gluckman et Hanson, 2004 ; Hanson et Gluckman, 2014

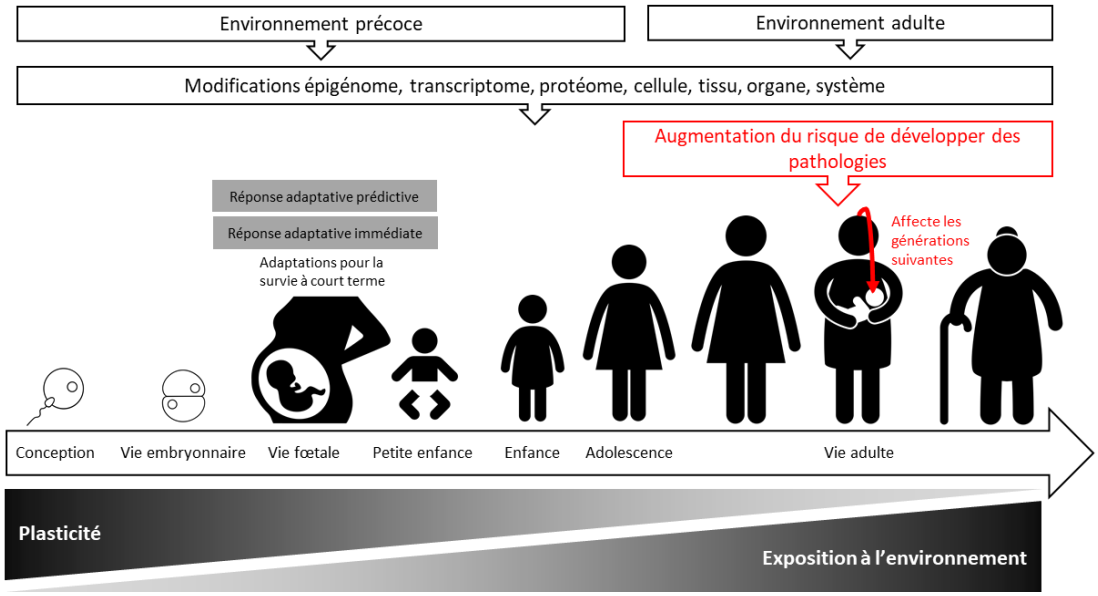


Figure A.31. Résumé du concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD)

L'exposition à un environnement précoce délétère entraine des modifications allant de l'épigénome au système de l'individu afin de favoriser la survie à court terme qui peuvent augmenter le risque de développer des pathologies à l'âge adulte, surtout dans le cas d'un environnement adulte inadéquat. Ces modifications sont héritables et peuvent donc se transmettre aux générations suivantes.

Par exemple, les individus exposés à la famine Hollandaise *in utero*, donc carencés durant la vie précoce, n'étaient pas adaptés à un environnement post-natal riche et ont donc développé des pathologies tels que de l'obésité ou des maladies cardio-vasculaires (Painter *et al.*, 2005; Roseboom *et al.*, 2006).

3.1.4. Mécanismes sous-jacents

La modulation de l'héritage génétique par l'environnement précoce passe au moins en partie par l'épigénétique. Le terme épigénétique comprend tous les facteurs héritables capables de modifier le phénotype indépendamment de changements de la séquence d'ADN. Ainsi, les principaux mécanismes moléculaires sous-jacents comprennent la méthylation de l'ADN, la modification des histones et les ARN non codants (Grewal and Moazed, 2003; Jaenisch and Bird, 2003; Jammes et al., 2011). Ces différents mécanismes vont entrainer des modifications dans la compaction de la chromatine et donc moduler la disponibilité de lecture pour les machineries de transcription, ou encore contrôler la demi-vie des ARN après transcription. Les marques épigénétiques peuvent être transitoires ou stables, programmées ou acquises et ont la propriété d'être héritables par mitose (Godfrey *et al.*, 2007; Allis et Jenuwein, 2016; Toranõ *et al.*, 2016).

3.1.5. Conclusion

Le concept de la DOHaD, largement démontré chez l'homme et l'animal, permet de faire le lien entre héritage génétique et héritage environnemental du phénotype (Hanson et Gluckman, 2014). Ainsi, l'environnement précoce dans lequel se développe l'individu, s'il est délétère, va augmenter son risque de développer des pathologies à l'âge adulte, d'autant plus si l'environnement à l'âge adulte est éloigné de l'environnement précoce. Les modifications phénotypiques observées sont alors la résultante de modifications épigénétiques qui peuvent être héritables si elles se réalisent dans les gamètes de l'individu. La Figure A.31 résume le concept des origines développementales de la santé et des maladies.

3.2. Origines Développementales de la Santé et des Maladies chez les animaux d'intérêt agronomique

Le nombre d'études réalisées sur les Origines développementales de la Santé et des Maladies sur l'espèce équine est relativement restreint (40 études trouvées sur 677 000 réponses Google Scholar pour le terme « developmental programming »). C'est pourquoi, afin de mettre en perspective et de compléter les résultats observés sur l'espèce équine, cette partie est dédiée à la DOHaD au sein des animaux de rente autres que les chevaux.

3.1.1. Effet du génotype maternel

Etudier l'effet du génotype maternel permet de démontrer à quel point l'environnement dans lequel se développe l'embryon puis le fœtus peut influencer son développement *in utero*.

Il a été montré chez le porc que les porcelets issus d'un croisement entre des porcs Meishan (poids adulte environ 200 kg) et des Yorkshire (poids adulte environ 300 kg) naissent plus légers s'ils ont été portés par une truie Meishan que par une truie Yorkshire (Biensen *et al.*, 1999).
De la même manière, chez la vache, les veaux issus d'un croisement entre des bovins de race South Devon (poids adulte environ 790 kg) et Dexter (poids adulte environ 340 kg) portés par une vache de race South Devon sont plus lourds à la naissance (moyenne 33 kg) que les veaux portés par une vache de race Dexter (moyenne 27 kg) (Joubert et Hamond, 1958).
De plus, les embryons de race Charolais transférés dans des vaches Brahman naissent plus légers (moyenne 29 kg) que des embryons de race Charolais portés par des vaches Charolaises (moyenne 63 kg). Inversement, les embryons de race Brahman transférés dans des vaches de race Charolaise naissent plus lourds (moyenne 41 kg) que les embryons de race Brahman portés par des vaches Brahman (moyenne 19 kg) (Ferrell, 1991).

Ainsi ces résultats montrent que la taille et le génotype de la mère a une influence importante sur la croissance *in utero* des descendants.

3.1.2. Effet de l'alimentation maternelle

Les modifications des régimes alimentaires des animaux gestants sont très variées. Ici ne seront présentés que ceux qui permettent de mieux comprendre ou de compléter certains effets observés au sein de l'espèce équine. La DOHaD étant un domaine fortement étudié, ce chapitre ne se veut donc pas exhaustif.

3.1.2.1. Surnutrition et obésité

Dans les études suivantes, la surnutrition en cours de gestation est souvent confondue avec l'obésité. L'obésité sera définie ici comme une augmentation de l'adiposité au-dessus d'un certain seuil (défini par les auteurs des études) avant la mise à la reproduction et durant toute la gestation. Ainsi les études de surnutrition ne concernent ici que les animaux surnourris durant la gestation et rendus obèses par ce biais. La surnutrition peut être définie par une augmentation générale de la quantité d'aliments proposés à l'animal, mais également comme l'augmentation de l'énergie contenue dans la ration en l'enrichissant avec un aliment particulier (céréales ou huile par exemple). Il est difficile de séparer

Tableau 7. Résumé des études réalisées sur l'effet de la surnutrition chez la brebis sur le développement post-natal de la descendance

Surnutrition	Période de surnutrition	Fonction	Age	Phénotype	Source
Surnutrition péri-conceptionnelle					
150%	De 17 jours pré-insémination jusqu'à 6 jours après	Croissance	Naissance	= Poids vif	Kleeman *et al.*, 2015
			5 jours	↗ Poids des ovaires	
Surnutrition début de gestation					
Ad libitum	100 premiers jours de gestation (2 premiers tiers)	Endocrinologie	103 jours de gestation	↘ Concentration Progestérone	Da Silva *et al.*, 2003
		Fonction ovarienne		↘ Nombre follicules primordiaux ↘ Nombre total follicules	
175%	De 30 à 80 jours de gestation	Croissance	Naissance à 5 mois	= Poids vif	Sen *et al.*, 2016
		Fonction musculaire	5 mois	↗ Densité de fibres	
Surnutrition fin de gestation					
126%	Dès 116 jours de gestation	Croissance	1 jour	= Poids vif ↗ Poids du coeur	Hoffman *et al.*, 2014
			3 mois	↘ Poids vif	
		Endocrinologie	De 1 jour à 3 mois	↘ Concentration IGFBP3 ↗ Concentration leptine	
		Expression de gènes	1 jour	↗ Expression *IGF1* foie ↗ Expression *β-caténine* muscle (stimule la différenciation des cellules souches en cellule musculaire)	
155%	Dès 115 jours de gestation	Métabolisme glucidique	De 1 à 30 jours	↗ Glycémie à jeun ↘ % d'AMPK phosphorylée dans le foie (peut contribuer à ↗ production de glucose par le foie)	Philp *et al.*, 2008
150%	Dès 105 jours de gestation	Croissance	De la naissance à 2 mois	= Poids vif	Khanal *et al.*, 2014
			De 2 mois à 6 mois	↘ Poids vif	
		Etat corporel	6 mois	↘ % Tissu adipeux sous-cutané ↘ Tissu adipeux sous cutané / Tissu adipeux viscéral	
Surnutrition durant la majorité de la gestation					
140%	Dès 31 jours de gestation	Croissance	De 1 jour à 3 mois	↗ Poids vif, périmètre thoracique	Reed *et al.*, 2014 Hoffman *et al.*, 2016 Pillai *et al.*, 2017
			1 jour	↗ Longueur	
		Endocrinologie	3 mois	↗ Concentration IGF1 ↗ Concentration IGFBP2 ↗ Concentration leptine	
		Métabolisme glucidique	3 mois	↗ Ratio insuline/glucose basal ↗ Resistance à l'insuline	
		Fonction musculaire	1 jour	↗ Aire des fibres (coupe transversale) ↗ Expression de *myostatine*	
			3 mois	↘ Aire des fibres (coupe transversale)	
			De 1 jour à 3 mois	↗ Accumulation lipidique musculaire	
Modélisation de l'obésité – surnutrition sur toute la gestation					
150%	Dès 60 jours avant l'insémination	Gestation		↘ Durée de gestation	Long *et al.*, 2010 Huang *et al.*, 2012 Zhang et al., 2012 Long et al., 2015
		Croissance	De la naissance à 19 mois	= Poids vif	
		Métabolisme glucidique	135 jours de gestation	↘ Cellules β pancréatiques ↗ Production insuline par cellules β restantes	
			Naissance	↗ Glycémie basale ↘ Insulinémie basale ↘Poids pancréas	
			19 mois	↗ Resistance à l'insuline ↘ Disposition du glucose par transporteurs indépendants de l'insuline	
		Fonction musculaire	2,5 ans (mâles)	↗ Concentration de collagène (=↗ fibrose) ↘ Expression des metalloprotéases ↗ Expression de l'inhibiteur des metalloprotéases	
		Endocrinologie	2 – 3 ans (mâles)	↗ Concentration de leptine	

l'effet de l'obésité de celui de la surnutrition dans le cas des études portant sur les animaux de rente car l'obésité n'est pas un objectif recherché pour la production de viande et/ou de lait.

L'effet de la surnutrition maternelle a principalement été étudiée chez la brebis, c'est pourquoi ce paragraphe sera dédié à ce modèle (Tableau 7). La surnutrition maternelle a peu d'effet sur le poids vif des agneaux à la naissance et durant la croissance (Hoffman *et al.*, 2014, 2016; Khanal *et al.*, 2014; Kleemann *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2016). La surnutrition maternelle augmente l'expression d'*IGF-1* dans le foie (Hoffman *et al.*, 2014) et la concentration d'IGF-1 plasmatique chez les agneaux (Hoffman *et al.*, 2016). Les agneaux nés de brebis surnourries ont également des altérations du développement musculaire (accumulation lipidique) (Hoffman *et al.*, 2014; Reed *et al.*, 2014), associés avec une augmentation de la résistance à l'insuline (Hoffman *et al.*, 2016), une hyperglycémie basale et des altérations des voies de signalisation hépatiques (Philp *et al.*, 2008) et de l'adiposité corporelle (Khanal *et al.*, 2014). Enfin, les fœtus issus de brebis surnourries présentent des altérations du développement des ovaires en fin de gestation et à la naissance (diminution du nombre de follicules primordiaux et du nombre total de follicules, augmentation du poids des ovaires) (Da Silva *et al.*, 2003; Kleemann *et al.*, 2015).

Lorsqu'ils sont exposés à un régime *ad libitum* à l'âge adulte (19-22 mois), les descendants de brebis surnourries consomment plus d'aliments, ont un gain de poids vif et de tissu adipeux sous cutané et viscéral plus important, associés à une glycémie et une insulinémie basales plus élevées, ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines GLUT4 et des transporteurs des lipides CD36, FATP1 et FATP4 dans les différents tissus adipeux (Long *et al.*, 2010, 2015). Ce challenge alimentaire altère classiquement et de manière importante les paramètres métaboliques des descendants de brebis témoins (augmentation de la résistance à l'insuline, augmentation de la disposition du glucose par les transporteurs indépendants de l'insuline et augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas). Mais les altérations sont plus légères chez les animaux nés de brebis surnourries (Long *et al.*, 2010).

Chez la brebis toujours, l'effet de l'obésité maternelle a été modélisé en :

- Surnourrissant les mères depuis 2 mois avant la gestation jusqu'à l'agnelage (Tableau 7). L'obésité maternelle n'a pas d'influence sur le poids de naissance des agneaux, mais altère durant le développement fœtal (135 jours de gestation), à la naissance et à l'âge adulte (2,5 ans) leur métabolisme glucidique : les descendants présentent une diminution du nombre de cellules β-pancréatiques durant la vie fœtale, une hyperglycémie, un hypoinsulinémie et une diminution du poids du pancréas à la naissance ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline et altération du système de régulation de la glycémie indépendant de l'insuline à l'âge adulte. A l'âge adulte la

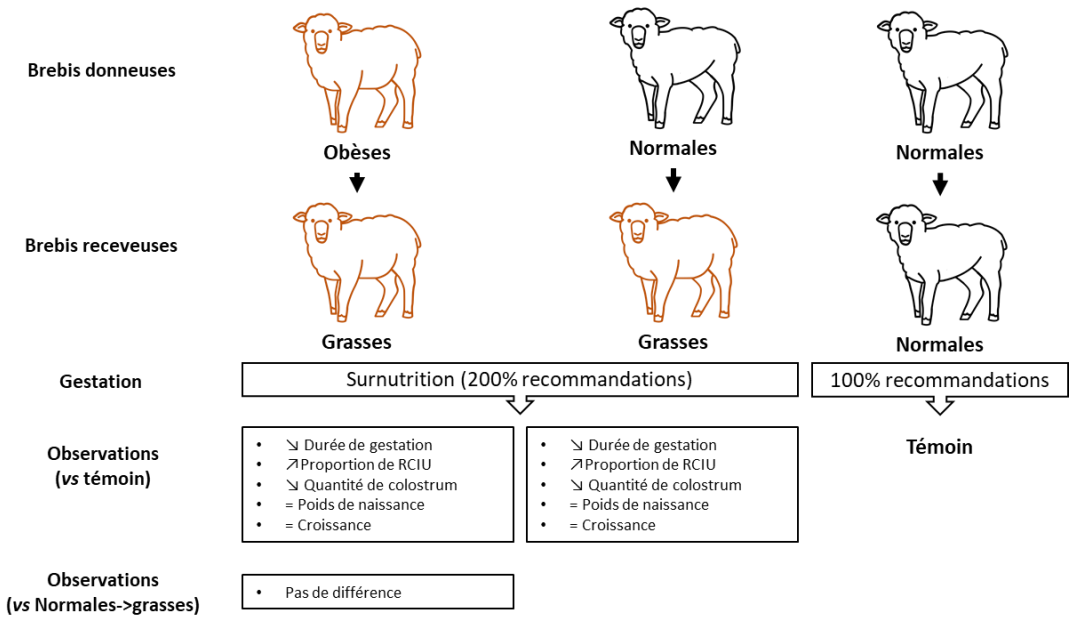


Figure A.32. Résumé de l'effet de l'interaction entre l'état corporel péri-conceptionnel et l'état corporel durant la gestation, effet de l'obésité chez la brebis

Les brebis receveuses grasses ont produit des agneaux de même poids de naissance et de même croissance malgré une gestation plus courte, une proportion de retards de croissance intra-utérin augmentée et une diminution de la quantité de colostrum produite. L'adiposité de la brebis donneuse d'embryon n'a pas eu d'effet sur ces paramètres.

D'après Wallace et al., 2017.

surnutrition maternelle altère leur développement musculaire (fibrose) et entraine une augmentation de leur leptinémie (Long *et al.*, 2010, 2015; Huang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

- Transférant des embryons produits par des brebis adultes obèses ou normales dans des jeunes brebis déjà grasses puis surnourries durant la gestation (Figure A.32). Les jeunes brebis obèses ont une gestation plus courte et, malgré une absence de différence de poids de naissance avec les agneaux témoins, produisent plus d'agneaux en retard de croissance intra-utérin. De plus, ces brebis produisent une quantité de colostrum moins importante. L'adiposité des brebis donneuses d'embryon n'a cependant pas eu d'effet sur ces paramètres dans les deux groupes (Wallace *et al.*, 2017).

Chez la vache, une surnutrition à hauteur de 125% à partir de 3 mois de gestation entraine une augmentation du poids de naissance des veaux sans différence de poids au sevrage à 4 mois. Les veaux issus des vaches surnourries ou nourries selon leurs besoins ne présentaient de plus pas de différence de qualité de carcasse à l'âge de 5 mois (Wilson *et al.*, 2016).

La surnutrition et l'obésité maternelle altèrent durablement la santé de la descendance en altérant le développement des métabolismes lipidiques et glucidiques, le comportement alimentaire ainsi que l'état corporel et le développement musculaire.

3.1.2.2. Sous-nutrition

De la même manière que pour la surnutrition, la brebis est une espèce qui a été intensivement étudiée comme modèle de sous-nutrition maternelle. Les effets de la sous-nutrition chez la brebis sont présentés en Tableau 8. La sous-nutrition maternelle influence le poids à la naissance lorsqu'elle est importante mais ses effets sont moins visibles lorsqu'elle est modérée (Bispham *et al.*, 2003; Gardner *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2014, 2016; Field *et al.*, 2015; Kleemann *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2016; Whorwood *et al.*, 2016). Les agneaux nés de brebis sous-nourries présentent une diminution de la concentration en IGF-1 et T3 de 1 jour à 3 mois et une augmentation de la concentration plasmatique ombilicale d'IGF-1 à 135 jours de gestation (Hoffman *et al.*, 2014; Field *et al.*, 2015) ainsi que des altérations de la fonction cortico-surrénalienne (augmentation de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes et diminution de l'expression de la 11β-hydroxysteroïde déshydrogénase dans de nombreux organes) (Whorwood *et al.*, 2016). Ces agneaux présentent également une augmentation de la quantité de lipides musculaires associée à des modifications du développement des fibres musculaires (augmentation puis diminution de l'aire des fibres en fonction de l'âge) (Ford *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2014). La sous-nutrition maternelle entraine également une hyperglycémie ou hyperinsulinémie ainsi qu'augmentation de réponse des cellules β du pancréas, associée à une diminution de la tolérance au glucose et de l'expression de GLUT4 dans le tissu adipeux

Tableau 8. Résumé des études réalisées sur l'effet de la sous-nutrition chez la brebis sur le développement post-natal de la descendance

Sous-nutrition	Période de sous-nutrition	Fonction	Age	Phénotype	Source
Sous-nutrition péri-conceptionnelle					
70%	De 17 jours pré-insémination jusqu'à 6 jours après	Croissance	Naissance	= Poids vif	Kleeman *et al.*, 2015
			5 jours	↗ Poids du foie	
Sous-nutrition début de gestation					
50%	28 à 79 jours de gestation	Croissance	135 jours de gestation	= Poids vif	Field *et al.*, 2015
50%	28 à 78 jours de gestation	Croissance	Naissance	↘ Poids vif	Ford *et al.*, 2007
			4 mois à 8 mois	↗ Poids vif	
		Etat corporel	8 mois	↗ Adiposité péri rénale et musculaire	
		Métabolisme	2 mois	↗ Glycémie basale ↗ Réponse des cellules β-pancréatiques	
			8 mois	↘ Réponse des cellules β-pancréatiques	
50%	28 à 77 jours de gestation	Croissance	Naissance	= Poids vif, ↗ longueur totale, ↗ poids des reins	Whorwood *et al.*, 2016
		Expression de gènes		↗ Expression *récepteur aux glucocorticoïdes* (surrénale, foie, poumon, tissu adipeux péri rénal, reins) ↘ Expression *11- β-HSD* (surrénale, reins, converti le cortisol en cortisone)	
40%	28 à 80 jours de gestation	Croissance	Naissance	↗ Poids vif	Bispham *et al.*, 2003
50%	30 à 80 jours de gestation	Croissance	Naissance	= Poids vif	Sen *et al.*, 2016
			5 mois	↘ Poids	
Sous-nutrition fin de gestation					
60%	Dès 116 jours de gestation	Croissance	1 jour	↘ Poids vif, ↘ périmètre thoracique	Hoffman et al., 2014
			3 mois	↘ Epaisseur de gras sous-cutané dos	
		Endocrinologie	1 jour	↘ Concentration T3	
			De 1 jour à 3 mois	↘ Concentration IGF1 ↘ Concentration IGFBP3	
50%	Dès 110 jours de gestation	Croissance	Naissance à 1 an	= Poids vif	Garnder *et al.*, 2005
		Métabolisme glucidique	1 an	↘ Tolérance au glucose ↘ Expression de GLUT4 dans le tissu adipeux péri rénal	
		Etat corporel	1 an	↗ Masse grasse	
50%	Dès 105 jours de gestation	Croissance	Naissance à 6 mois	↘ Poids vif	Khanal et al., 2014
			6 mois	↘ Tissu adipeux sous cutané / Tissu adipeux viscéral	
Sousnutrition durant toute la gestation					
50%	Dès 28 jours de gestation	Croissance	135 jours de gestation	= Poids vif, ↗ poids du foie	Field *et al.*, 2015
		Métabolisme glucidique		↗ Insulinémie ombilicale	
		Endocrinologie		↗ Concentration IGF1 ombilicale	
60%	Dès 31 jours de gestation	Croissance	De 1 jour à 3 mois	= Poids vif, longueur totale	Reed *et al.*, 2014 Hoffman *et al.*, 2016
			3 mois	↗ Poids du cœur	
		Etat corporel	3 mois	↘ Epaisseur de gras sous-cutané dos	
		Métabolisme glucidique	3 mois	↗ Insulinémie basale ↗ Ratio insuline/glucose basal	
		Fonction musculaire	1 jour	↗ Aire des fibres (coupe transversale)	
			3 mois	↘ Aire des fibres (coupe transversale)	
			De 1 jour à 3 mois	↗ Accumulation lipidique musculaire	

péri-rénal (Gardner *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2016) ainsi qu'à une augmentation de la masse grasse péri-rénale avec ou sans diminution de la masse grasse sous-cutanée (Gardner *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2014, 2016).

Chez la chèvre, une sous-nutrition de 50 à 80% (progressif) à partir de 3 mois de gestation diminue le poids de naissance des mâles uniquement, ainsi que la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés des chevreaux à la naissance (Laporte-Broux *et al.*, 2011). De plus, les descendants femelles issus des chèvres sous-nourries en fin de gestation consomment plus d'aliments que les femelles nées des chèvres témoins à 1 et 2 ans, pour un même poids. Cela impliquerait une efficacité alimentaire diminuée chez les descendantes de chèvres sous-nourries. Cependant entre 6 et 24 mois, les deux groupes de chèvres ne présentent pas de différences de métabolisme (insuline et leptine basales et test de tolérance au glucose) (Laporte-Broux *et al.*, 2012).

Chez la vache, la sous-nutrition à hauteur de 80% des besoins (=20% d'énergie en moins) entre 3 et 6 mois de gestation (sur 9 mois) diminue l'épaisseur de gras au niveau de la douzième côte et augmente le ratio gras intramusculaire/gras intermusculaire des veaux à 7 mois (Mohrhauser *et al.*, 2015). Les vaches sous-nourries à hauteur de 60% des besoins entre 30 et 85 jours de gestation ou entre 30 et 140 jours produisent des veaux de même poids à la naissance que les vaches nourries à 100% des besoins, malgré un poids hépatique plus important (Prezotto *et al.*, 2016).

Chez le lapin, une sous-nutrition maternelle à hauteur de 50% des besoins de 7 à 19 jours de gestation ou de 20 à 27 jours de gestation (sur 31 jours) diminue le poids de naissance des lapereaux, sans altérer leur croissance post-natale, leur comportement alimentaire ou leur composition corporelle jusqu'à 2,5 mois (Lopez-Tello *et al.*, 2017).

La sous-nutrition maternelle lorsqu'elle est importante altère durablement la santé de la descendance en altérant le développement des métabolismes lipidiques et glucidiques, ainsi que l'état corporel et le développement musculaire.

3.1.3. Effet du métabolisme maternel

Indépendamment de l'alimentation, le métabolisme maternel peut être modifié par un grand nombre de facteurs. L'insulinorésistance est en général associée à l'obésité. Dans le cas des animaux de rente, elle peut être associée aux besoins de production, comme chez la vache. Les vaches hautes productrices de lait sont plus à risque de développer de l'insulinorésistance du fait des besoins très importants en nutriments pour la production de lait et donc de la balance énergétique négative (Bossaert *et al.*, 2008; De Koster et Opsomer, 2013; Zachut *et al.*, 2013; Opsomer *et al.*, 2017). Cette

insulinorésistance de lactation peut subsister lors des gestations suivantes. Ainsi, les vaches résistantes à l'insuline en fin de gestation produisent des veaux plus légers avec une concentration plasmatique en IGF-1 diminuée ainsi qu'une insulinémie basale augmentée à la naissance (Kawashima *et al.*, 2016).

3.1.4. Effet de la parité maternelle

L'étude de l'effet de l'âge et de la parité maternelle sur le développement des nouveau-nés jusqu'à l'âge adulte est d'autant plus importante que ces états physiologiques sont obligatoires et qu'il n'existe pour le moment pas de moyen de les contourner. Dans le cas des productions animales, âge et parité sont souvent colinéaires. Les jeunes individus étant primipares et les plus âgés multipares, du fait des contraintes de production. De plus, en général dans le cas de la vache laitière, les primipares n'ont pas de lactation concomitante tandis que les multipares sont à la fois gestantes et en lactation.

Chez les bovins, les génisses (primipares) ont une gestation moins longue et produisent des veaux plus légers (plus légers environ de 9%) et plus petits à la naissance (Kertz *et al.*, 1997; Kamal *et al.*, 2014, 2015). Ces veaux ont également un indice corporel (poids / (hauteur au garrot * longueur)) plus bas à la naissance (Kamal *et al.*, 2014, 2015). Cependant, les veaux nés de génisse ne présentent pas d'altération du métabolisme glucidique à la naissance (Kamal *et al.*, 2015). De plus, le colostrum des génisses est moins riche en calcium, phosphore et magnésium que le colostrum des vaches multipares (Kume et Tanabe, 1993).

3.2. Origines Développementales de la Santé et des Maladies chez l'équin

3.2.1. Influence de l'environnement maternel sur le phénotype de la descendance

En 2015, environ 21 359 embryons équins ont été transférés dans le monde (Perry, 2016). La jument receveuse est plus souvent choisie pour des raisons pratiques ou économiques et se révèle donc parfois être d'une taille ou d'une race différente du futur poulain. L'effet d'une inadéquation importante entre les génotypes maternels et fœtaux sur le développement à long terme des poulains est désormais relativement bien compris.

3.2.1.1. Effet du génotype maternel

Le Tableau 9 reprend le résumé des résultats des études présentées ci-dessous.

3.2.1.1.1. Insémination artificielle entre races de différentes tailles

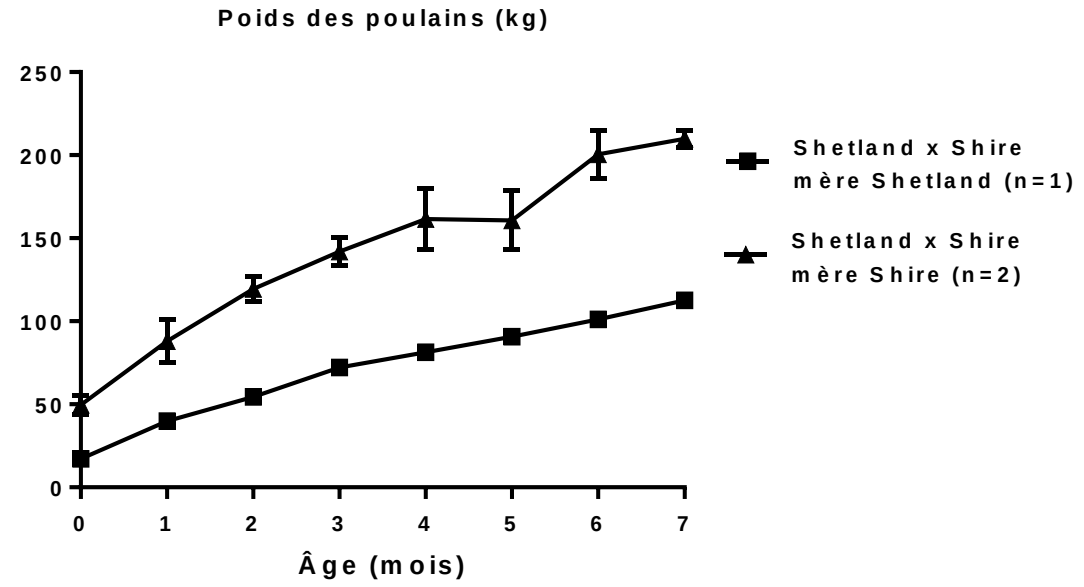


Figure A.33. Evolution du poids des poulains Shetland x Shire en fonction du génotype maternel jusqu'à 7 mois
D'après Walton and Hammond, 1938.

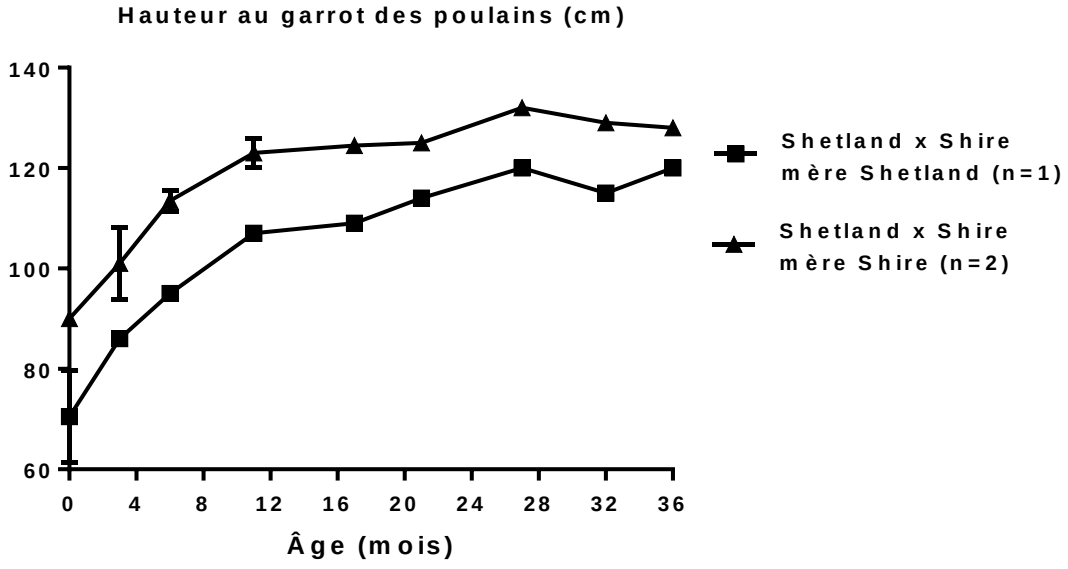


Figure A.34. Evolution de la hauteur au garrot des poulains Shetland x Shire en fonction du génotype maternel jusqu'à 36 mois
D'après Walton and Hammond, 1938.

Entre 1933 et 1937, Walton et Hammond ont réalisé des inséminations artificielles entre des poneys de race Shetland (poids moyen : 200 kg) et des chevaux de trait de race Shire (poids moyen : 800 kg). Ils ont ainsi pu démontrer que le poids de naissance du poulain ainsi que sa croissance étaient fortement influencés par la taille de la mère : les poulains croisés Shetland x Shire issus de juments de race Shire étaient nés plus lourds que les poulains issus de juments de race Shetland (49,4 k *vs* 17,8 kg soit 64% plus lourds). De plus, ces poulains étaient toujours plus lourds que les poulains nés de juments de race Shetland à l'âge de 6 mois (Figure A.33) et plus grands jusqu'à l'âge de 36 mois (Figure A.34) (Walton et Hammond, 1938).

3.2.1.1.2. Transfert d'embryon entre races de différentes tailles

Trois différentes études ont été réalisées en transférant des embryons de race de grande taille (Pur-sang Anglais ou Anglo-Arabes) dans des juments de petite taille (poney Welsh) et en transférant des embryons de race de petite taille (poneys Welsh ou poneys Konik) dans des juments de grande taille (Pur-sang Anglais, Anglo-Arabe ou cheval de trait). Les résultats de ces études sont « en miroir » : ils sont inversés selon que l'embryon est transféré dans une jument de grande taille (excès de croissance fœtale) ou de petite taille (restriction) par rapport à sa race (Tableau 9).

3.2.1.1.2.1. <u>Croissance restreinte</u>

Les chevaux de selle transférés dans des ponettes naissent plus petits et plus légers que des chevaux de selle portés par des juments de selle : ils sont en retard de croissance intra-utérin (RCIU) et souffrent de dysmaturité à la naissance (Allen *et al.*, 2002a; Peugnet *et al.*, 2014). Ces poulains ont une croissance réduite jusqu'au sevrage puis une croissance de rattrapage disharmonieuse après le sevrage (Allen *et al.*, 2004; Peugnet *et al.*, 2014, 2016b). Ils restent cependant plus petits que les poneys jusqu'à l'âge de 3 ans (Allen *et al.*, 2004). Ce retard de croissance est associé à une augmentation de la concentration en T3 à 3 jours, ainsi qu'à une glycémie à jeun plus élevée jusqu'à 180 jours cependant sans différence de métabolisme glucidique mesuré *via* des tests de tolérance au glucose intraveineux (IVGTT) et des clamps euglycémiques hyperinsulinémiques (Forhead *et al.*, 2004; Peugnet *et al.*, 2014). Ces poulains ont une sensibilité plus élevée du baroréflexe à 6 jours, une cortisolémie plus élevée de la naissance à 2 jours et une sécrétion plus élevée de catécholamines en réponse à un stress aigu à 6 jours (Giussani *et al.*, 2003). A 6 mois, 100% de ces poulains présentent des lésions d'ostéochondrose contre uniquement 29% des poulains de selle témoins. Cette différence a disparu à 18 mois (Peugnet *et al.*, 2016b).

3.2.1.1.2.2. <u>Croissance amplifiée</u>

Tableau 9. Résumé des études réalisées sur l'effet du génotype maternel sur le développement de la descendance en post-natal

Race de l'embryon	Race de la jument	Fonction	Age	Phénotype	Source
Insémination artificielle					
Shetland x Shire	Shetland *vs* Shire	Croissance	Jusqu'à 6 mois	↘ Poids	Walton et Hammond (1938)
			Jusqu'à 3 ans	↘ Hauteur au garrot	
Croissance restreinte					
Pur-sang Anglais	Poney Welsh	Croissance	Jusqu'à 18 mois	↘ Poids (RCIU)	Allen *et al.*, (2002) Allen *et al.*, (2004) Forhead *et al.*, (2004) Giussani *et al.*, (2003)
			Jusqu'à 9 mois	↘ Hauteur au garrot	
			Jusqu'à 3 ans	↘ Longueur totale, hauteur de membre, largeur de canon	
		Métabolisme glucidique	2 jours	Pas de différence	
		Fonction cardiovasculaire	Jusqu'à 2 jours	↗ cortisolémie basale	
			6 jours	↗ Sensibilité du baroréflexe	
		Fonction cortico-surrénalienne	6 jours	↗ Sécrétion catécholamines en réponse au stress aigu	
Anglo-Arabe	Poney Welsh	Croissance	Jusqu'à 6 mois	↘ Poids (RCIU), largeur des épaules, largeur des hanches	Peugnet *et al.*, (2014) Peugnet *et al.*, (2016)
			Jusqu'à 18 mois	↘ Hauteur au garrot, périmètre thoracique, hauteur de membre, largeur de canon	
		Métabolisme glucidique	Jusqu'à 18 mois	↗ Glycémie à jeun	
		Endocrinologie	3 jours	↗ Concentration T3	
			18 mois	↘ Concentration AGNE	
		Ostéochondrose	6 mois	100% des poulains atteins d'OC	
			18 mois	Pas de différence	
Croissance amplifiée					
Poney Konik	Cheval de trait	Croissance	Jusqu'à 6 mois	↗ Poids	Tischner, (1985) Tischner et Klimczak, (1989) Tischner, (2000)
			Jusqu'à 13 ans	↗ Hauteur au garrot, largeur canons et paturons	
Poney Welsh	Pur-sang Anglais	Croissance	Jusqu'à 3 ans	↗ Poids, hauteur de membre, largeur de canon	Allen *et al.*, (2002) Allen *et al.*, (2004) Forhead *et al.*, (2004) Giussani *et al.*, (2003)
			Jusqu'à 5 mois	↗ Hauteur au garrot	
		Métabolisme glucidique	2 jours	↗ Sécrétion insuline en réponse à un bolus de glucose	
		Fonction cardiovasculaire	6 jours	↗ Pression artérielle ↘ Sensibilité du baroréflexe	
		Fonction cortico-surrénalienne	6 jours	↘ sécrétion catécholamines en réponse au stress aigu	
Poney Welsh	Cheval de trait	Croissance	Jusqu'à 18 mois	↗ Poids, hauteur au garrot, hauteur de membre, largeur de canon, périmètre thoracique, largeur des hanches	Peugnet *et al.*, (2014) Peugnet *et al.*, (2016)
		Métabolisme glucidique	Jusqu'à 18 mois	↘ Glycémie à jeun	
			3 jours	↘ Sensibilité à l'insuline	
		Endocrinologie	Jusqu'à 6 mois	↘ Concentration T3	
			Jusqu'à 3 jours	↘ Concentration T4	
			Jusqu'à 18 mois	↗ Concentration AGNE	
		Ostéochondrose	Jusqu'à 18 mois	Pas de différence	
Anglo-Arabe	Cheval de trait	Croissance -Métabolisme Endocrinologie - Ostéochondrose	De 0 à 18 mois	Pas de différence	Peugnet *et al.*, (2014) Peugnet *et al.*, (2016)

Les poneys transférés dans des chevaux de selle ou des chevaux de trait sont plus lourds et plus grands à la naissance et jusqu'à l'âge de 3 ans (Tischner, 1985, 2000; Tischner et Klimczak, 1989; Allen *et al.*, 2002a, 2004, Peugnet *et al.*, 2014, 2016b). Cette différence de taille au garrot est toujours présente à l'âge de 13 ans chez les poneys polonais transférés dans des juments de trait (Tischner, 2000). Ces poneys ont une concentration en T3 diminuée jusqu'à 180 jours et en T4 diminuée à la naissance et à 3 jours associées à une glycémie diminuée jusqu'à 180 jours (Peugnet *et al.*, 2014). A 2 et 3 jours, ces poneys ont une résistance à l'insuline ainsi qu'une réponse des cellules β-pancréatiques accrues par rapport aux poneys témoins. Cette différence a disparu à 200 jours (Forhead *et al.*, 2004; Peugnet *et al.*, 2014). Les embryons de poneys transférés dans des juments Pur-sang Anglais ont une pression artérielle augmentée, associée à une sensibilité du baroréflexe diminuée, ainsi qu'une diminution de la sécrétion de catécholamines en réponse au stress aigu et une augmentation de la réponse du cortisol à l'ACTH à 6 jours (Giussani *et al.*, 2003). Les poulains ne présentent pas de différence de lésions d'ostéochondrose entre les lots (Peugnet *et al.*, 2016b).

Des embryons de chevaux Anglo-Arabe ont également été transférés dans des juments de traits. Cependant aucune différence n'a pu être mise en évidence entre ces poulains et les selles témoins.

3.2.1.1.3. Effet des techniques de production des embryons

Les précédents travaux se basent sur des techniques de production des embryons telles que le transfert d'embryon. Les données des effets de la culture des embryons et de l'effet du transfert lui-même sur le développement de la descendance sont très parcellaires dans de nombreuses espèces voire presque absentes au sein de l'espèce équine.

Il semble que le poids du poulain à la naissance ou encore l'expression génique dans le placenta ne soient pas modifiés par la méthode de production de l'embryon (insémination artificielle, transfert d'embryon après fécondation in vivo ou transfert d'embryon après fécondation in vitro) (Lanci et al., 2017; Valenzuela et al., 2017).

Le génotype maternel (taille de la jument, métabolisme) a donc une influence importante sur le développement *in utero* et post-natal du poulain jusqu'à très long terme et l'interaction génotype maternel x génotype du poulain doit donc être judicieusement prise en compte dans le choix de la jument receveuse.

3.2.1.2. Effet de l'alimentation maternelle

3.2.1.2.1. Surnutrition

Tableau 10. Résumé des études réalisées sur l'effet de la surnutrition maternelle sur le développement de la descendance en post-natal

Traitement	Race	Sujet	Fonction	Age	Phénotype	Source
Juments nourries à 85% des besoins dès 8 mois de gestation (NRC 1978) Juments nourries à 175% des besoins dès 8 mois de gestation (NRC 1978)	Quarter Horse	Juments	Etat corporel	Poulinage	Juments sous-nourries maigres (NE=1,6/5) Jument surnourries en surpoids (NE=4,1/5)	Henneke *et al.*, (1984)
			Gestation		Pas de différence	
		Poulains	Croissance	Jusqu'à 3 mois	Pas de différence (poids)	
Juments sous-nourries dès 8 mois de gestation	Quarter Horse	Poulains	Croissance	Naissance	Pas de différence (poids)	Banach et Evans (1981)
Juments nourries à 85% des besoins dès 8 mois de gestation (NRC 1978)	Quarter Horse	Juments	Etat corporel	Poulinage	Juments sous-nourries maigres (NE=1,5/5) Juments témoins normales (NE=3,75)	Hines *et al.*, (1987)
			Gestation		↗ Durée de gestation (+9 jours)	
Juments nourries à 85% des besoins durant toute la gestation (NRC 1973)	Demi-sang Arabe	Juments	Lait	Jusqu'à 1 mois de lactation	↗ % de protéines	Sutton *et al.*, (1977)
				Jusqu'à 1 mois	Pas de différence (poids)	
			Métabolisme	Jusqu'à 1 mois	↗ Cholestérol sérique ↗ Urée sérique	
Juments atteintes par la gourme (*streptococcus equi*) à mi-gestation	Pur-sang Anglais	Juments	Poids	Poulinage	↘ Poids (-20kg)	Wilsher et Allen, (2006)
		Poulains	Croissance	Naissance	↘ Poids (-2,4kg)	

La surnutrition, comme démontré au **chapitre 1**, est une des causes de la haute prévalence mondiale d'obésité au sein de l'espèce équine. Il est donc fort possible qu'un pourcentage important de juments gestantes soit également surnourri.

Les résultats de la revue de la littérature sur l'effet de la surnutrition chez la jument gestante et le développement du poulain sont résumés dans le Tableau 10. Une seule étude a comparé la descendance de juments nourries à 100% (témoins) ou 150% (surnourries) des besoins selon les recommandations NRC de 1978 à partir du 2ème mois de gestation jusqu'au poulinage (Kubiak *et al.*, 1988, 1991). Cela correspond, pour le groupe témoin, à 98% des besoins NRC 2007 jusqu'au 5ème mois de gestation puis 91% des besoins NRC 2007 jusqu'au poulinage et pour le groupe surnourri, à 147% des besoins NRC 2007 jusqu'au 5ème mois de gestation puis 137% des besoins NRC 2007 jusqu'au poulinage (NRC, 1978, 2007).

Au poulinage, les juments surnourries sont obèses (NE = 4,90) et plus grasses que les juments témoins (NE=3,1). Les auteurs n'observent pas de différence de biométrie des poulains à la naissance (poids, mensurations, note d'état et épaisseur de gras sous-cutané) (Kubiak *et al.*, 1988). Cependant, à l'âge de 2 mois, les poulains nés des juments surnourries sont plus légers avec un périmètre thoracique moins important que les poulains nés des juments témoins (Kubiak *et al.*, 1991). Ces résultats sont associés à une tendance de production de lait plus importante chez les juments témoins sans différence de qualité jusqu'à 2 mois de lactation (Kubiak *et al.*, 1991).

Une autre étude, comparant des juments sous-nourries avec des juments surnourries en gestation ne montre pas d'effet de la surnutrition sur la durée de gestation et la croissance des poulains jusqu'à 3 mois (Henneke *et al.*, 1984).

La surnutrition ne semble pas affecter le poids de naissance du poulain mais diminuer la production laitière de la jument et donc potentiellement la croissance du poulain.

3.2.1.2.2. Sous-nutrition

Dans certains cas ou certaines filières (*e.g.* filière viande ou loisir), les juments gestantes peuvent être restreintes pour des raisons économiques (Martin-Rosset, 2012). De même, il peut arriver que la jument contracte une pathologie au cours de la gestation, conduisant à une sous-nutrition maternelle ou uniquement fœtale.

La sous-nutrition de la jument a très peu d'effet sur la biométrie du poulain à la naissance (Tableau 11). Une sous-nutrition chronique (modérée à importante puisque certaines juments ont une note d'état de 1,5/5 au poulinage) en fin de gestation n'entraine pas d'effet sur le poids et les mensurations du poulain à la naissance, laissant supposer que dans ce cas la jument est capable de mobiliser ses

Tableau 11. Résumé des études réalisées sur l'effet de la sous-nutrition maternelle sur le développement de la descendance en post-natal

Traitement	Race	Sujet	Fonction	Age	Phénotype	Source
Juments nourries à 150% des besoins dès 2 mois de gestation (NRC 1978)	Quarter Horse	Juments	Etat corporel	Poulinage	Juments surnourries obèses (NE=4,9/5) Juments témoins normales (NE=3,1/5)	Kubiak *et al.*, (1988) Kubiak *et al.*, (1991)
			Gestation		Pas de différence	
			Lait	Jusqu'à 2 mois de lactation	↘ Production laitière (tendance)	
		Poulains	Croissance	Naissance	Pas de différence (poids, mensurations, état corporel)	
				2 mois	↘ Poids et périmètre thoracique	
Juments nourries à 175% des besoins dès 8 mois de gestation (NRC 1978) Juments nourries à 85% des besoins dès 8 mois de gestation (NRC 1978)	Quarter Horse	Juments	Etat corporel	Poulinage	Jument surnourries en surpoids (NE=4,1/5) Juments sous-nourries maigres (NE=1,6/5)	Henneke *et al.*, (1984)
			Gestation		Pas de différence	
		Poulains	Croissance	Naissance	Pas de différence (poids)	
				Jusqu'à 3 mois	Pas de différence (poids)	

propres réserves pour permettre une croissance optimale du poulain (Sutton *et al.*, 1977; Banach et Evans, 1981; Henneke *et al.*, 1984; Peugnet *et al.*, 2015).

Cependant, une sous-nutrition importante associée à une pathologie entraine une diminution du poids de naissance des poulains (Wilsher et Allen, 2006). Dans le cas présenté les juments ont été atteintes par la gourme (*streptococcus equi*), qui est une pathologie des voies pulmonaires qui évolue en abcès au niveau des nœuds lymphatiques. Les juments de cette étude avaient donc cessé de s'alimenter à la mi-gestation pendant une période de 15 jours et donc perdu beaucoup de poids. Dans ce cas, les juments avaient subi un stress aigu beaucoup plus important qu'une sous-nutrition chronique, ce qui peut expliquer les effets sur le développement *in utero* des poulains.

Peu de suivis de la croissance et du métabolisme post-nataux ont été réalisés. La sous-nutrition maternelle ne semble cependant pas modifier la croissance des poulains jusqu'à l'âge de 6 mois (Sutton *et al.*, 1977; Henneke *et al.*, 1984). De plus, les juments sous-nourries durant la gestation présentaient une augmentation du taux protéique du lait, associé à une augmentation des concentrations sériques de cholestérol et d'urée chez le poulain jusqu'à 1 mois (Sutton *et al.*, 1977).

La jument semble capable de pouvoir mobiliser ses réserves pour soutenir la croissance fœtale, quelle que soit la quantité de nutriments disponibles. Cependant, dans le cas de la pathologie par exemple, cette capacité serait utilisée au profit de la défense immunitaire, affectant bien plus fortement le développement *in utero* du poulain.

3.2.1.2.3. Enrichissement de la ration avec de l'amidon (céréales)

Comme il a été présenté dans le **chapitre 1**, les éleveurs nourrissent en grande majorité leurs juments gestantes en supplémentant leur ration avec des concentrés. Bien que fréquente, cette pratique est aujourd'hui associée à des altérations du développement à long terme des poulains (Tableau 12).

L'ajout de concentrés dans la ration en comparaison avec un régime alimentaire composé uniquement de fourrages permet aux juments de maintenir un état corporel stable tout au long de la gestation (Karren *et al.*, 2010; Thorson *et al.*, 2010; Peugnet *et al.*, 2015) mais réduit la sensibilité à l'insuline des juments en fin de gestation (Peugnet *et al.*, 2015) et a un effet controversé sur leur leptinémie (Cavinder *et al.*, 2012; Peugnet *et al.*, 2015). De plus, l'ajout de concentrés dans la ration maternelle diminue la quantité d'immunoglobulines (Ig) G dans le lait jusqu'à 18h après le poulinage (Thorson *et al.*, 2010).

Ces différentes rations n'influencent pas la biométrie des poulains de la naissance à 6 mois (Thorson *et al.*, 2010; Peugnet *et al.*, 2015) mais augmente leur tolérance au glucose à 3 jours (Peugnet *et al.*, 2015), ainsi que leur leptinémie jusqu'à 18 heures après la naissance sans modifier leur fonction corticosurrénalienne (Cavinder *et al.*, 2012).

Tableau 12. Résumé des études réalisées sur l'effet d'une ration de céréales et de fourrages ou de fourrages uniquement dans la ration maternelle sur le développement de la descendance en post-natal

Traitement	Race	Sujet	Fonction	Age	Phénotype	Source
Juments qui reçoivent des concentrés ou des fourrages en gestation	Cheval de selle Belge	Poulains	Ostéochondrose		Concentrés : prévalence 30,8 – 33,7% Fourrages : prévalence 4,2%	Vander Heyden *et al.*, (2012)
Juments nourries avec des céréales (orge) et des fourrages ou uniquement des fourrages dès le 6ème mois de gestation	Anglo-Arabe	Juments	Etat corporel	Poulinage	Juments concentrés normales (NE=3.75/5) Juments fourrages sous-nourries (NE=2.25/5)	Peugnet *et al.*, 2015
			Métabolisme	9 mois de gestation	↘ Sensibilité à l'insuline	
				Gestation	↘ AGNE Pas de différence leptine	
		Poulains	Croissance	Jusqu'à 6 mois	Pas de différence (poids et mensurations)	
			Métabolisme	3 jours	↗ Tolérance au glucose (tendance)	
			Ostéochondrose	3 jours et 6 mois	Pas de différence (IGF-1, T3, T4, AGNE)	
				6 mois	↗ poulains atteins d'OC (tendance)	
Juments nourries avec des céréales et en pâture ou uniquement en pâture dès le 6ème mois de gestation	Quarter Horse	Juments	Etat Corporel	Poulinage	Juments pâture sous-nourries (NE=2.3/5) Juments concentrés normales (NE=3.3/5)	Karren *et al.*, (2010) Thorson *et al.*, (2010) Cavinder *et al.*, (2012)
			Métabolisme	18 derniers jours de gestation	↗ Leptine	
		Poulains	Croissance	Naissance	Pas de différence (poids et mensurations)	
			Métabolisme	18 heures post-poulinage	↗ Leptine	
			Fonction cortico-surrénalienne	1 an	Pas de différence	
Juments nourries avec un régime riche en amidon (HS) ou riche en lipides (LS) dès le 6ème mois de gestation (régime isoénergétique)	Pur-sang Anglais	Juments	Etat corporel	2 semaines avant terme	Juments HS normales (NE=3.25) Juments LS normales mais moins grasses (NE=2.9)	George *et al.*, (2009)
		Poulains	Métabolisme	Jusqu'à 2,5 mois	↗ Glycémie basale	
				5 jours	↗ Potentiel d'action absolu de l'insuline (DI)	
				2 mois	↗ Insulinémie basale	
				2 mois	↘ Disposition du glucose médiée par les transporteurs indépendants de l'insuline (Sg)	
				4 mois	↘ Sensibilité à l'insuline (tendance) (SI)	

De plus, à 6 mois, plus de poulains de juments du lot concentrés présentent des lésions d'ostéochondrose que de poulains nés de juments du lot fourrage (Peugnet *et al.*, 2015). Ces résultats ont précédemment été observés par une étude épidémiologique réalisée en Belgique (région Wallonie) : les juments qui reçoivent des concentrés (sans distinction de qualité ni de quantité) au cours de la gestation, avec ou sans fourrages, ont plus de risques de produire des poulains qui présentent des lésions d'ostéochondrose que les juments qui ne reçoivent que des fourrages (Vander Heyden *et al.*, 2012).

Une étude a également été réalisée pour comprendre si les altérations observées suite à la distribution de céréales aux juments gestantes étaient dues à leur haute valeur énergétique ou à la qualité de cette énergie. Ainsi, les poulains issus des juments ayant reçu une ration riche en amidon à partir du 6ème mois de gestation présentent une glycémie basale plus importante jusqu'à 2,5 mois d'âge que les poulains nés de juments qui ont reçu une ration riche en lipides, ainsi qu'une augmentation du potentiel d'action de l'insuline à 5 jours comme ce qui était observé par Peugnet et al., (2015) malgré le fait que les deux rations soient isocaloriques (George *et al.*, 2009). Cependant, à 4 mois, ces poulains tendent à avoir une sensibilité à l'insuline diminuée (George *et al.*, 2009). Ainsi ce serait bien la quantité d'amidon disponible dans les céréales qui serait à l'origine des altérations du métabolisme chez les poulains en croissance et non pas la haute valeur énergétique des céréales.

Supplémenter la jument gestante avec des concentrés n'altère pas la croissance *in utero* et post-natale du poulain. Cependant, cela affecte sa capacité de régulation de l'homéostasie glucidique ainsi que sa santé ostéoarticulaire, indépendamment de la quantité en énergie offerte par la ration.

3.2.1.2.4. Enrichissement de la ration avec des acides gras ω-3 (EPA et DHA)

Bien que la composition en lipides des rations des chevaux soit naturellement faible, l'ajout de lipides sous forme principalement d'huile végétale est utilisé en supplémentation pour augmenter l'efficacité énergétique, diminuer l'excitabilité de la ration ou encore augmenter l'oxydation des acides gras pendant l'exercice (NRC, 2007). De plus, la supplémentation en acides gras polyinsaturés à longue chaîne permet de mimer, chez des animaux confinés, des profils en acides gras plus proches de ce qui est apporté par la pâture et d'améliorer les paramètres métaboliques (Hess et al., 2013). La supplémentation en acides gras ω-3 tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (obtenus à partir de l'huile de poissons) est principalement conseillée par les nutritionnistes équins pour modifier la fluidité de la membrane plasmique et moduler la réponse inflammatoire des cellules immunitaires (NRC, 2007).

L'enrichissement de la ration de juments de selle en surpoids avec des acides gras ω-3 de 47,5 jours avant l'insémination jusqu'à 12,5 jours de gestation semble améliorer l'environnement utérin pour l'implantation de l'embryon : les juments supplémentées ont une expression augmentée des gènes codant pour les enzymes qui catalysent la synthèse des prostaglandines ainsi que pour le récepteur à l'ocytocine et les conceptus présentent une expression augmentée des gènes marqueurs du développement du trophoblaste et de l'endoderme (Jacobs et al., 2017).

Il a également été montré que l'enrichissement de la ration de la jument gestante avec de l'EPA et du DHA 60 jours avant le poulinage entraine une augmentation de la quantité de ces acides gras dans le plasma des mères et des poulains jusqu'à 2 mois, mais n'entraine pas de différence de durée de gestation, de concentration plasmatique d'IGF-1 et de progestérone chez la jument. Chez le poulain, la supplémentation maternelle n'entraine pas de différence de concentration plasmatique et synoviale d'ostéocalcine, de prostaglandine E2 et de progestérone (Buist *et al.*, 2015).

Supplémenter les juments avec du DHA ou de l'huile de poisson de la fin de la gestation jusqu'à environ 3 mois après le poulinage augmente la quantité d'acides gras de DHA et d'EPA dans le plasma maternel, le lait et le plasma ombilical mais ne modifie pas la composition en immunoglobulines du plasma maternel et du colostrum, ni la glycémie et l'insulinémie chez la jument et le poulain (Adkin *et al.*, 2013; Hodge *et al.*, 2017).

Supplémenter la jument gestante avec des acides gras ω-3 en fin de gestation ne semble, pour le moment, pas avoir d'autres effets que celui d'augmenter de certains acides gras ω-3 dans le plasma du poulain. La supplémentation avant l'insémination pourrait potentiellement avoir plus d'effets, puisqu'elle semble favoriser le développement de l'embryon.

3.2.1.2.5. Supplémentation en vitamines, minéraux et acides-aminés (sélénium, cuivre, vitamine E, arginine)

Certains éléments sont utilisés en supplément de la ration pour leurs propriétés antioxydantes, leur rôle dans la croissance ostéoarticulaire ou encore leurs propriétés vasodilatatrices.

3.2.1.2.5.1. <u>Supplémentation en sélénium</u>

Les chevaux sont principalement supplémentés avec du sélénium pour ses propriétés antioxydantes (NRC, 2007). En effet, le sélénium est un composant indispensable à la glutathion peroxydase, qui catalyse la détoxification de certains ROS (Battin et Brumaghim, 2009).

La supplémentation en sélénium dans l'alimentation de la jument gestante à partir de 6 mois de gestation ne modifie pas son état corporel, ni la concentration en leptine et IGF-1 plasmatiques durant la gestation mais augmente la concentration en sélénium plasmatique, musculaire et du

colostrum sans altérer l'activité de la glutathion péroxydase plasmatique chez la jument (Karren *et al.*, 2010; Cavinder *et al.*, 2012). Les poulains nés de juments supplémentées avec du sélénium ont une augmentation des concentrations plasmatiques et musculaires en sélénium jusqu'à 3 mois sans modification de l'activité de la glutathion péroxydase plasmatique, ni modification des concentrations plasmatiques d'IGF-1 ou de la cortisolémie (Karren *et al.*, 2010; Cavinder *et al.*, 2012). Cependant, ces poulains avaient une leptinémie plasmatique moins élevée que les poulains des juments non supplémentées en moyenne durant les 36 heures qui suivent le poulinage (Cavinder *et al.*, 2012). La supplémentation de la ration maternelle en sélénium ne modifie pas la durée de gestation, les mensurations du poulain à la naissance, les paramètres de poulinage (temps que le poulain met à se lever et à téter), ni la quantité d'IgG présents dans le lait jusqu'à 24 heures après le poulinage (Thorson *et al.*, 2010).

La supplémentation maternelle en sélénium semble donc avoir peu d'effets chez les poulains sur les paramètres mesurés.

3.2.1.2.5.2. Supplémentation en vitamine E

La vitamine E ou tocophérol est utilisée en supplémentation chez le cheval pour ses propriétés antioxydantes (NRC, 2007).

La supplémentation en vitamine E (α-tocophérol) dans la ration des juments à partir du 9ème mois de gestation entraine une augmentation de la quantité de vitamine E dans le plasma 2 jours après le poulinage, dans le lait durant les 3 premiers jours post-natauxs, ainsi que dans la fraction lipidique du lait durant les 2 premiers jours post-nataux (Bondo et Jensen, 2011). De plus, à 2 et 3 jours après le poulinage, la concentration en IgG et IgM était plus importante dans le lait des juments supplémentées que des juments témoins (Bondo et Jensen, 2011). Un même résultat a également été observé dans le cas où les juments étaient supplémentée en péripartum (Hoffman *et al.*, 1999). De plus, les poulains des juments supplémentées avaient une concentration plasmatique en vitamine E plus élevée que les poulains nés de juments témoins ainsi qu'une concentration plasmatique en IgM plus élevée à 3 jours (Bondo et Jensen, 2011).

La supplémentation de la jument gestante ou allaitante en vitamine E augmenterait donc la quantité en immunoglobulines du lait et du poulain.

3.2.1.2.5.3. Supplémentation en arginine

L'arginine est un acide aminé non essentiel chez le cheval qui peut être dégradé en monoxyde d'azote (NO), polyamines, urée, ornithine, proline, glutamate, créatine et/ou agmatine. Le NO est un agent

vasodilatateur, la créatine a une activité anti-oxydante, réduit la réponse inflammatoire et augmente la tolérance au glucose. De plus, le NO et les polyamines stimulent la prolifération et la migration cellulaire.

Chez la jument, une supplémentation en arginine de courte durée (100g/jour, du 21ème jour avant le poulinage théorique jusqu'au 7 jours après le poulinage) ne modifie pas le poids des poulains à la naissance, mais entraînerait un raccourcissement de la durée de gestation de 12 jours (Mortensen *et al.*, 2011). Dans une autre étude, la supplémentation en arginine (50g/jour, 90 derniers jours avant le poulinage et durant les 14 jours post-partum) n'a pas modifié la durée de gestation ni la morphométrie du poulain mais les juments supplémentées présentaient une clairance plus rapide du fluide utérin après poulinage (Mesa *et al.*, 2015).

La supplémentation en arginine des juments en lactation (50g/j) diminue la proportion de lactose dans le lait au 5ème mois de lactation mais n'a pas d'autre effet sur la composition du lait en glutamine, glutamate, proportion de lipides, de protéines et d'urée (Hunka *et al.*, 2016). Cette supplémentation ne modifie pas la biochimie plasmatique des juments ni des poulains, ni la croissance et l'adiposité des poulains (Hunka *et al.*, 2016).

Une supplémentation de la jument gestante en arginine, si elle ne semble pas avoir d'effet sur le poids à la naissance du poulain semble cependant augmenter le flux sanguin artériel chez les juments. La supplémentation en arginine des juments allaitantes quant à elle ne semble pas avoir d'effet sur le poulain jusqu'à la fin de la période de lactation.

3.2.1.3. Effet de l'obésité et des pathologies métaboliques

L'étude de l'obésité comme définie dans le **paragraphe 3.2.2.1.** est presque inexistante chez le cheval. Une seule étude prend en compte la note d'état de la jument dès l'insémination et au cours de toute la gestation. Les auteurs ont observé une relation positive entre le poids de naissance des poulains et la note d'état, relation cependant très faible (r^2=0,02) qui ne semble donc pas être un résultat biologique mais statistique (Smith *et al.*, 2016). Les auteurs ont également observé une corrélation négative entre la concentration en leptine maternelle en fin de gestation (241-300 jours) et le poids de naissance du poulain (r^2=0,41) (Smith *et al.*, 2016).

3.2.1.4. Effet de la parité, de l'âge de la jument et de la saison de reproduction

3.2.1.4.1. Effets sur le phénotype

Les juments primipares produisent des poulains plus petits et plus légers à la naissance que les juments multipares, quelle que soit la race ou s'ils sont issus ou non de transfert d'embryon (Doreau *et al.*,

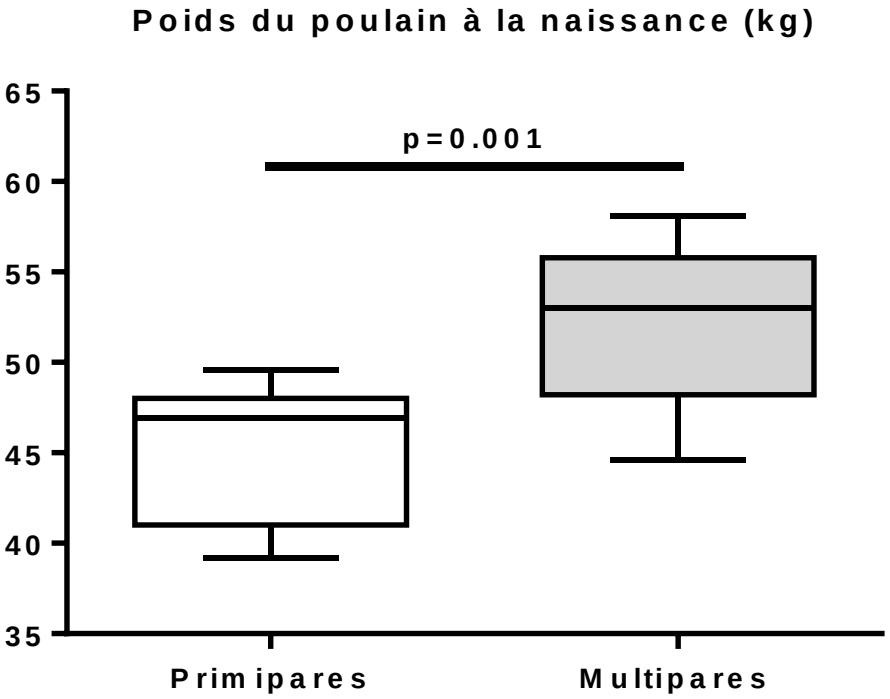


Figure A.35. Poids de naissance des poulains en fonction de la parité maternelle
D'après Doreau et al., 1991 ; Lawrence et al., 1992 ; Wilsher et Allen, 2003 ; Elliott et al., 2009 ; Meirelles et al., 2017 ; Serrano-Recalde et al., 2017

1991; Lawrence *et al.*, 1992a; Pool-Anderson *et al.*, 1994; Cymbaluk et Laarveld, 1996; Wilsher et Allen, 2003; Elliott *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2014; Vazquez *et al.*, 2015; Klewitz *et al.*, 2015; Affonso *et al.*, 2016; Meirelles *et al.*, 2017; Serrano-Recalde *et al.*, 2017). Un résumé des travaux précisant les poids des poulains à la naissance est présenté en Figure A.35 et Tableau 13. De plus, chez le Pur-Sang Anglais, le Mangalarga Paulista et le Cheval de Sport Brésilien, le poids de naissance du poulain augmente avec l'âge de la mère, mais cette association est principalement liée à la parité de la jument (Wilsher et Allen, 2003; Elliott *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2014; Meirelles *et al.*, 2017). En effet, la parité de la mère est très fortement reliée à son âge, les juments primipares étant plus souvent des juments jeunes, tandis que les juments âgées ont souvent une parité plus élevée.

Les poulains issus des juments primipares restent plus petits que ceux nés de multipares jusqu'à 1 an et plus légers jusqu'à au moins 4 mois (Pool-Anderson *et al.*, 1994; Cymbaluk et Laarveld, 1996; Fernandes *et al.*, 2014; Meirelles *et al.*, 2017). Ces différences de croissance sont associées à des concentrations sériques en IGF-1 diminuées chez les poulains issus de juments primipares jusqu'à l'âge de 4 mois (Cymbaluk et Laarveld, 1996).

Il a été montré que les juments de trait primipares produisent un lait moins gras et moins riche en énergie que les juments multipares, sans différence de quantité produite au cours de la lactation (Doreau *et al.*, 1991). De plus, chez le cheval de race Konik, la proportion d'acides gras saturés à chaîne moyenne est moins importante tandis que la proportion d'acides gras non saturés est plus importante chez les juments de parité faible (≤5) que chez les juments de parité plus élevée (>5) sans différence de quantité totale de lipides (Pikul *et al.*, 2008). Les juments Quarter Horse primipares produisent moins de lait que les juments multipares jusqu'à 60 jours de lactation (-1.3L) sans différence de composition (Pool-Anderson *et al.*, 1994). Chez d'autres juments Quarter Horse, la quantité de lait produite ne varie pas entre la première et la deuxième lactation mais augmente à partir de la 3ème lactation (+1.3L) (Gibbs *et al.*, 1982). En plus des différences de race, les différences de mesure de la quantité de lait dans ces études (mesure de la quantité d'eau par dosage de l'oxyde de deutérium (eau lourde) pour la première étude, pesée du poulain avant et après la tétée pour les deux dernières) ainsi que les différences de nutrition des juments peuvent expliquer ces différents résultats entre les études.

Suivant la race, les poulains des jeunes juments (3 à 7 ans) sont plus petits jusqu'à 6 mois ou 1 an et demi que les poulains des juments âgées de 8 ans (Hintz *et al.*, 1979; Klewitz *et al.*, 2015; Meirelles *et al.*, 2017). De la même manière, les poulains nés de juments âgées de plus de 14 ans sont plus petits à 510 jours de 1 à 5 cm que les juments âgées de 8 ans (Hintz *et al.*, 1979; Klewitz *et al.*, 2015). La production laitière de juments Mangalarga Marchador n'est pas différente entre des juments âgées de 8 à 11 ans et des juments âgées de 16 à 19 ans sans information cependant sur la qualité du lait

Tableau 13. Poids de naissance des poulains en fonction de la parité maternelle

Wilsher et Allen (2003) ont comparé un lot de juments primipares et un lot de juments multipares (a) mais également les poulains de mêmes juments deux années de suite : primipares la première année et donc multipares la deuxième année (b).

Race	Primipares (kg)	Multipares (kg)	Source
Anglo-Arabe	48,0 ± 4,0 (n=7)	53,0 ± 3,0 (n=8)	Doreau *et al*., (1991)
Pur-sang Anglais	49,6 ± 6,6 (n=74)	55,8 ± 6,0 (n=143)	Elliott *et al*., (2009)
		58,1 ± 6,6 (n=82)	
		57,3 ± 7,2 (n=49)	
Quarter Horse	41,0 ± 0,95 (n=3)	48,2 ± 2,1 (n=9)	Lawrence *et al*., (1992)
Brazilian sport horse Mangalarga Paulista	39,2 ± 1,1 (n=12)	48,1 ± 1,8 (n=18)	Mereilles *et al*., (2017)
		44,6 ± 3,3 (n=10)	
Pur-sang Anglais[a]	49,6 ± 4 (n=24)	52,4 ± 0,7 (n=41)	Wilsher et Allen, (2003)
		58,1 ± 1,3 (n=10)	
		55,8 ± 2,3 (n=9)	
Pur-sang Anglais[b]	46,9 ± 1,0 (n=11)	54,8 ± 1,7 (n=11)	Wilsher et Allen, (2003)

(Santos et al., 2005). Chez le cheval Konik, l'âge de la jument influence faiblement la composition en acides gras du lait (Pikul *et al.*, 2008). Il n'existe pas, à ma connaissance, d'autres études traitant de la production laitière des juments en fonction de leur âge.

3.2.1.4.2. Effets sur la performance

De nombreux facteurs peuvent avoir une influence sur la performance d'un cheval durant sa carrière sportive. Parmi eux : La génétique (Aldridge *et al.*, 2000; Villela *et al.*, 2002; Ricard, 2004; Thiruvenkadan *et al.*, 2009a, b; Ricard et Blouin, 2011; Friedrich *et al.*, 2013; Posta *et al.*, 2014; da Gama *et al.*, 2016; Negro Rama *et al.*, 2016; Seierø *et al.*, 2016), le tempérament (McBride et Mills, 2012; Lansade *et al.*, 2016), la conformation (Holmström et Philipsson, 1993; Wallin *et al.*, 2001), les pathologies du sport et les pathologies transmissibles (Mumford et Rossdale, 1980; Martin *et al.*, 1996; Wilsher *et al.*, 2006; Pirrone *et al.*, 2007), l'entrainement (Sobczyńska, 2007; Verheyen *et al.*, 2009; Ely *et al.*, 2010; Szarska *et al.*, 2014), la nutrition (Oldham *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1992; Frape, 1994; Glade, 1994; Hughes *et al.*, 1995; Lacombe *et al.*, 2003) et la qualité du cavalier/driver/jockey.

Ces facteurs sont directement mesurables (entrainement, nutrition, pathologies, tempérament) ou de mieux en mieux connus et maîtrisés (génétique, cavalier). Ils ne seront pas développés ici car ils n'entrent pas dans le sujet de la thèse. Cependant certains facteurs maternels influencent également la performance du cheval athlète.

3.2.1.4.2.1. <u>Taille au garrot</u>

Il a été montré que la taille au garrot et à la pointe des hanches des chevaux influence leurs performances en course de galop. En effet, les chevaux plus grands ont significativement plus de chances de réaliser de bonnes performances (Dolvik et Klemetsdal, 1999; Smith *et al.*, 2006).
De plus, aux Etats-Unis, il a été montré que les yearlings les plus grands et les plus lourds étaient ceux qui se vendaient aux prix les plus importants aux ventes aux enchères de Pur-sang Anglais. La note d'état n'influençait cependant pas le prix des enchères (Pagan *et al.*, 2005).

3.2.1.4.2.2. <u>Parité et âge de la jument</u>

Peu de travaux ont évalué l'effet de la parité et de l'âge de la jument sur les performances des poulains. De plus, les études disponibles ne concernent que les chevaux de course Pur-Sang Anglais, qui commencent leur véritable carrière athlétique beaucoup plus tôt que les chevaux de sport (vers 2 ans, alors qu'ils sont encore en croissance). Ainsi, suivant les études, les poulains nés à la 3ème ou 4ème parité sont les plus performants de leur fratrie (Finocchio, 1985; Finocchio *et al.*, 1985; Barron, 1995). La performance est moins importante pour les poulains des juments primipares et surtout pour les

poulains à partir de la 9ème naissance (Barron, 1995). Cette relation est également observée pour l'âge de la jument, puisque les poulains nés de juments âgées de plus de 16 ans sont beaucoup moins performants que les poulains nés de juments plus jeunes (Barron, 1995). Cependant il a été montré chez le Pur-Sang Anglais que le premier poulain d'une jument avait moins de risque de souffrir de fracture en course que les poulains suivants et que le risque de fracture diminuait avec l'âge de la jument (Verheyen *et al.*, 2007).

Les plus grands poulains ayant plus de chance de réaliser de bonnes performances, les différences de développement et de croissance des poulains issus de juments primipares pourraient donc influencer leurs performances, surtout en tout début de carrière course, où ils sont encore jeunes et en croissance.

3.2.1.4.2.3. Saison de reproduction

Les poulains nés en début d'année (janvier, février, mars) naissent plus petits et/ou plus légers que les poulains nés entre les mois d'avril et de juillet (Hintz *et al.*, 1979; Beythien *et al.*, 2017). Cette différence peut toujours être observée à l'âge de 90 jours pour la hauteur au garrot et la hauteur de membre chez le cheval de selle Allemand et à l'âge de 510 jours pour le poids et la hauteur au garrot pour le Pur-sang Anglais (Hintz *et al.*, 1979; Beythien *et al.*, 2017).

Les poulains Pur-sang Anglais nés tard dans la saison (mai et après pour l'hémisphère Nord, octobre et après pour l'hémisphère Sud) ont tendance à avoir une carrière sportive plus longue que les autres (Physick-Sheard, 1986; More, 1998; Sobczyńska, 2007). Aucune étude n'a été réalisée sur l'influence de la saison de naissance sur les performances. Cependant il a été montré que les chevaux les plus performants étaient ceux qui avaient la durée de carrière sportive la plus longue en course et en concours de saut d'obstacle (Sobczyńska, 2007; Ricard et Blouin, 2011; Özen et Gürcan, 2016).
Comme pour la parité et l'âge de la jument, la taille au garrot du poulain semble être un facteur important dans la prise en compte de l'effet de la saison de naissance sur la performance.

3.2.1.5. Conclusion

L'environnement maternel a peu d'influence sur la croissance *in-utero* des poulains. Les facteurs qui pourraient influencer la croissance fœtale sont :

- **Une différence très forte entre le modèle de la mère porteuse et le modèle du futur poulain**
- **Une pathologie sévère de la jument associée à une sous-nutrition importante**
- **L'âge et la parité, qui sont associés avec des modifications de métabolisme maternel (voir Chapitre 2) et de fonction utérine (voir Chapitre 4).**

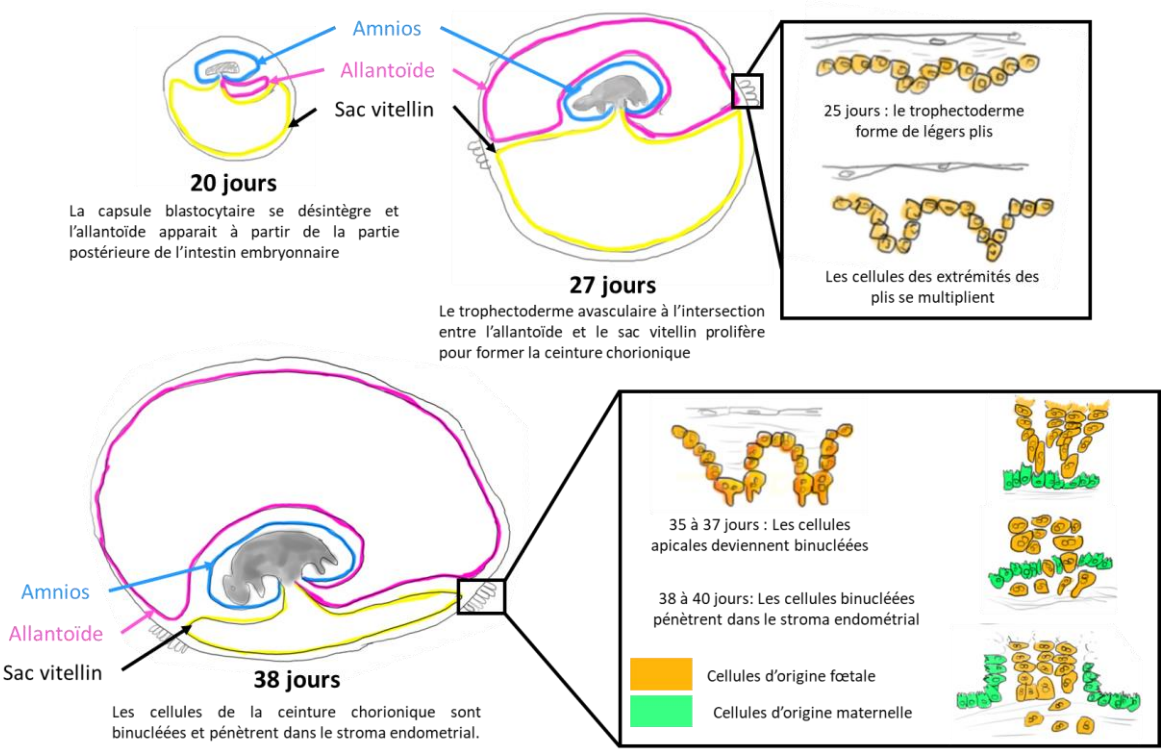


Figure A.36. Schémas représentant le développement précoce des membranes fœtales et de la ceinture chorionique jusqu'à 40 jours de gestation

D'après Allen et Stewart, 2001 ; Wooding, 2008 ; Allen et Wilsher, 2009

Cependant les facteurs nutritionnels, s'ils n'ont pas d'effet direct sur la croissance pré et post-natale de la descendance, peuvent influencer le développement des systèmes hormonaux très dépendant les uns des autres tels que :

- **La régulation de l'homéostasie glucidique**
- **Le métabolisme osseux et donc le développement de pathologies ostéoarticulaires**

Des travaux sont encore nécessaires pour mieux comprendre les effets des différentes pratiques d'élevage également sur la fonction de reproduction, le métabolisme lipidique, l'adiposité ainsi que l'inflammation de bas grade.

Une compréhension plus globale de ces effets permettra de mettre en avant des pratiques plus adaptées au bon développement des poulains et à la réalisation de leur potentiel génétique.

3.3. Le placenta, agent programmateur de la croissance fœtale

Le placenta est un organe transitoire à l'interface entre la mère et le fœtus. Il est impliqué dans les fonctions de nutrition et d'excrétion fœtale, d'échange gazeux mais également de production d'hormones et possède également des fonctions immunologiques. Du fait de son rôle particulier dans le contrôle de la croissance fœtale, il est considéré comme programmateur de la croissance fœtale et donc joue un rôle important dans le concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies.

3.3.1. Le placenta équin

3.3.1.1. Durée de gestation

Chez la jument, la durée de gestation est comprise entre 294 et 388 jours en fonction de la période d'insémination, du climat et de la photopériode (et donc de l'année), de la race de la jument, de son âge et de sa parité, de son état nutritionnel et du sexe du poulain (Morel *et al.*, 2002; Valera *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2007; Satué *et al.*, 2011a, b; Aoki *et al.*, 2013; Talluri *et al.*, 2016; Heck *et al.*, 2017).

3.3.1.2. Mobilité embryonnaire, fixation du conceptus et développement des annexes fœtales (Figure A.36)

Chez la jument, l'embryon entre dans l'utérus autour de 6-7 jours post-ovulation (jpo) alors au stade morula ou jeune blastocyte (Battut *et al.*, 1997). A ce moment et durant les 20-25 jours suivants, l'embryon s'entoure d'une capsule blastocytaire composée de glycoprotéines, synthétisées par le trophectoderme (Oriol *et al.*, 1993) qui :

- Empêche l'embryon de s'allonger (Betteridge, 1989) et a des propriétés antiadhésives (Oriol *et al.*, 1993), ce qui lui permet d'être déplacé plus facilement au travers de l'utérus
- Permet à l'embryon de supporter les fortes forces de propulsion liées aux contractions du myomètre (Allen et Wilsher, 2009)
- Aurait un rôle dans la régulation du mouvement de l'embryon et dans l'accumulation et l'assimilation des secrétions exocrines des glandes endométriales (sécrétions histotrophes). Durant les 40 premiers jours de vie de l'embryon, les sécrétions histotrophes sont sa principale source de nutriments (Allen et Wilsher, 2009).

Jusqu'à environ 16 jours de gestation, l'embryon va se déplacer dans l'utérus grâce à des contractions péristaltiques du myomètre en réponse à la production de prostaglandines embryonnaires (Stout et Allen, 2002).

Au 16-17ème jpo, la taille du conceptus ne lui permet plus d'avancer dans l'utérus et une augmentation soudaine du tonus du myomètre le fixe à la base d'une des deux cornes utérines (Van Niekerk, 1965; Ginther, 1983).

Entre 20 et 30 jpo, la capsule blastocytaire se désintègre, exposant alors le trophectoderme à l'environnement utérin (Stout, 2016). Les cellules trophoblastiques vont alors se développer sur la membrane choriovitelline externe et faire saillie dans les glandes endométriales afin de permettre au conceptus d'adhérer à l'endomètre et pour augmenter l'efficacité de la nutrition histotrophe (Amoroso, 1952; Allen et Stewart, 2001). L'allantoïde commence à apparaître à partir de la partie postérieure de l'intestin embryonnaire et croît rapidement jusqu'à entourer l'embryon et fusionner avec le chorion pour former l'allantochorion qui deviendra le placenta (Ewart, 1915).

3.3.1.3. Implantation du conceptus et développement du placenta

Chez la jument, la nutrition fœtale est réalisée par le biais de deux trophoblastes :

- Un **trophoblaste invasif transitoire** qui apparait autour de 30 jpo et disparait complètement entre 120 et 140 jpo
- Un **trophoblaste non invasif définitif** qui forme des interdigitations étroites avec l'endomètre qui assurent la nutrition haemotrophe du fœtus ainsi que des zones composées d'un trophoblaste colonnaire hyperabsorptif impliqué dans la nutrition histotrophe du fœtus

3.3.1.3.1. La ceinture chorionique et les cupules endométriales (Figure A.36)

Autour de 25-35 jpo, le trophectoderme avasculaire à l'interface entre l'allantoïde en croissance et le sac vitellin en régression prolifère pour former la **ceinture chorionique** (Allen, 1982; Enders et Liu,

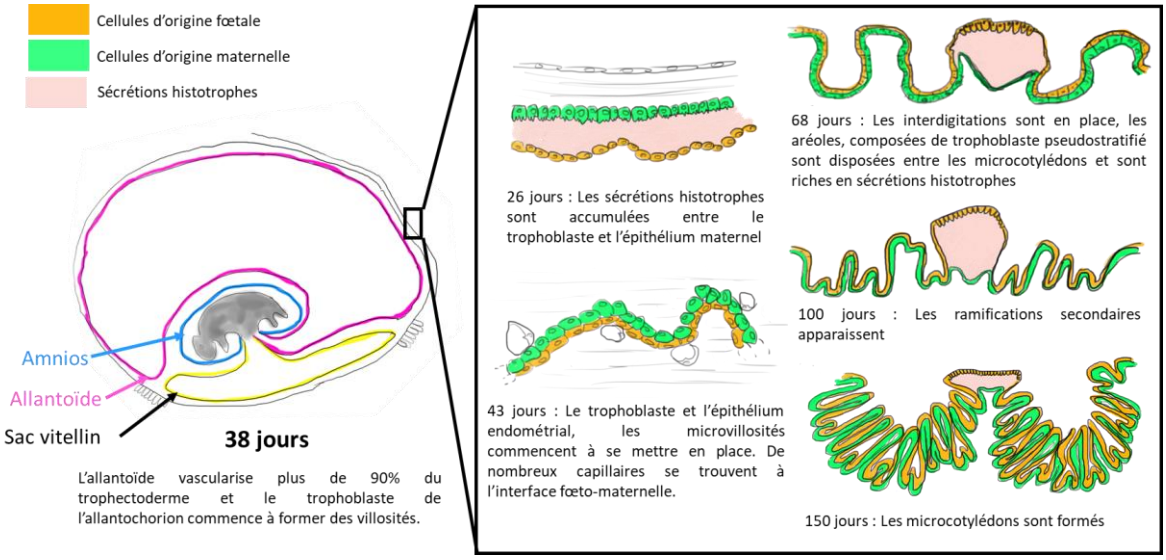


Figure A.37. Schémas représentant le développement du placenta non invasif et des microcotylédons jusqu'à 150 jours de gestation

D'après Samuel et al., 1974 ; Allen et Stewart, 2001 ; Wooding, 2008 ; Allen et Wilsher, 2009

1991a, b). A 25 jpo, le trophectoderme forme de légers plis. Les cellules à la pointe de ces plis se multiplient rapidement, si bien qu'au 32ème jpo, le trophectoderme forme des crêtes qui tendent à s'écraser et s'aplatir à la surface apicale du fait des forces de compression du conceptus en extension et du tonus du myomètre (Allen et Wilsher, 2009). Ainsi les fentes entre les crêtes forment des structures semblables à des glandes qui produisent des sécrétions exocrines qui permettent l'adhérence de la surface extérieure de la ceinture à la surface luminale de l'endomètre (Allen et Wilsher, 2009). Entre 35 et 37 jpo, les cellules apicales deviennent binucléées, la ceinture entière se sépare des couches sous-jacentes de trophoblaste et la ligne apicale commence à détruire l'épithélium luminal de l'endomètre (Allen *et al.*, 1973; Allen et Wilsher, 2009). Entre 38 et 40 jpo, les cellules binucléées pénètrent dans le stroma endométrial (Wooding *et al.*, 2001; Allen et Wilsher, 2009). Autour de 40-42 jpo, les cellules cessent de bouger et s'agrègent pour former un anneau d'origine fœtale et maternelle nommé **cupules endométriales** (Clegg *et al.*, 1954; Allen, 1975; Allen et Wilsher, 2009). Ces cupules produisent alors de l'hormone gonadotropine chorionique équine (eCG) qui permet la stimulation du développement d'une série de corps jaunes secondaires qui complètent les concentrations de progestérone plasmatique jusqu'au moment où le placenta pourra lui-même produire des progestagènes pour maintenir l'état gestant (Amoroso, 1952; Gospodarowicz, 1972). A 70 jpo, les cupules endométriales atteignent leur taille maximale puis commencent à se dégrader à 80-90 jpo (Allen et Stewart, 2001). Entre 120 et 140 jpo, les cupules sont nécrosées et libérées dans la lumière utérine (Allen et Stewart, 2001).

3.3.1.3.2. Le trophoblaste non invasif définitif (Figure A.37)

A 35-38 jpo, l'allantoïde a vascularisé plus de 90% du trophectoderme (Wooding et Burton, 2008). A 40 jpo le trophoblaste de l'allantochorion commence à former des microvillosités et établit ainsi un contact stable avec l'endomètre (Allen et Wilsher, 2009). Les villosités fœtales sont formées sur toute la surface du conceptus à l'exception de l'ouverture des glandes utérines où le trophoblaste se développe sous une forme de dôme nommé **aréole** composé de cellules colonnaires qui ont une capacité d'absorption très importante (Allen et Wilsher, 2009). A partir de 60 jpo les villosités s'allongent et se ramifient intensément (les ramifications secondaires apparaissent à 100 jpo) jusqu'à former à 120 jpo **les microcotylédons** (Samuel *et al.*, 1974). Jusqu'à la fin de la gestation, les villosités continuent à s'allonger et à se ramifier (Macdonald *et al.*, 2000). Autour de 150 jpo, les vaisseaux fœtaux se rapprochent du trophoblaste (Allen et Wilsher, 2009). A 250 jpo, ils sont avancés dans le trophoblaste et entourés par les cellules trophoblastiques sur 3 côtés. De plus, la lame basale du vaisseau a fusionné avec celle des cellules trophoblastiques. Dans le même temps, l'épithélium maternel diminue en hauteur, ce qui augmente la proximité entre les différents types cellulaires (Samuel *et al.*, 1976).

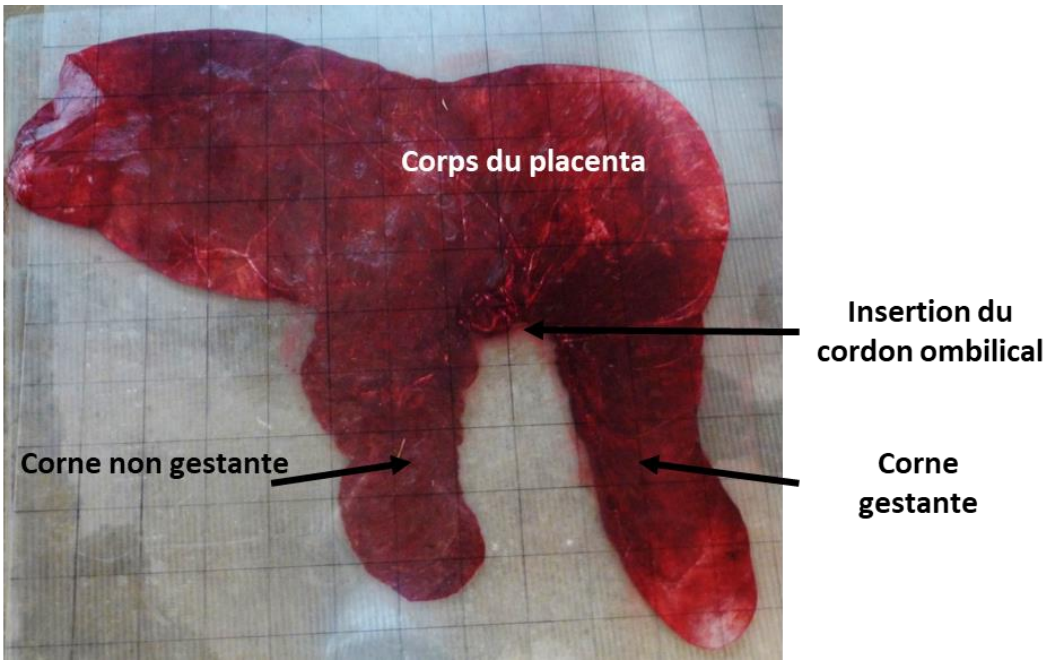


Figure A.38. Anatomie du placenta équin à terme, villosités microcotylédonaires à l'extérieur

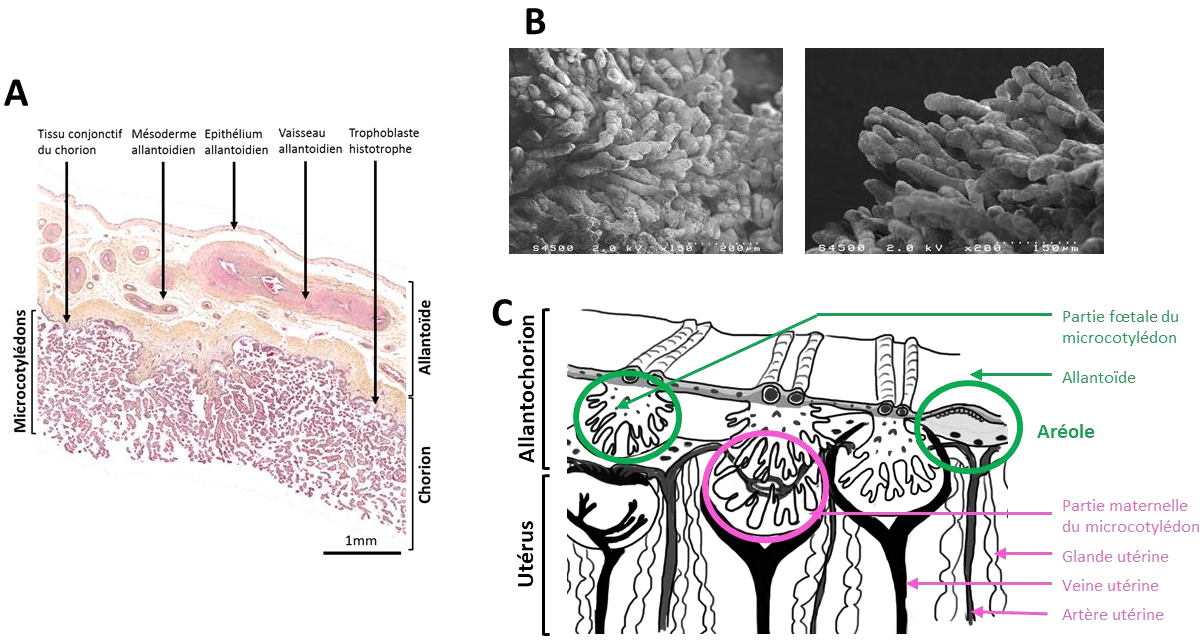


Figure A.39. Structure du placenta équin à terme

A. Coupe transversale de placenta à terme, coloration hématoxyline-éosine-saffran (7µm d'épaisseur). B. Microvillosités observées au microscope électronique à balayage (*Auteurs: Josiane Aïoun et Audrey Geeverding).* C. Schéma représentant la structure placentaire en 3 dimensions (*d'après Steven et Samuel., 1975*).

Le développement du fœtus équin se déroule donc longtemps (environ 40 jours) sans véritable placenta. Ainsi, la nutrition histotrophe par les sécrétions des glandes utérines est importante dans cette espèce en début de gestation. Le placenta équin se distingue par ses deux trophoblastes, un trophoblaste invasif et transitoire et un trophoblaste non invasif définitif. La nutrition fœtale via le placenta est donc réalisée durant la majeure partie de la gestation de manière haemotrophe au niveau des microcotylédons et de manière histotrophe au niveau des aréoles.

3.3.1.4. Structure et fonction du placenta définitif

Chez le cheval, le placenta mature est diffus, puisque les villosités recouvrent toute la surface de l'utérus et épithéliochorial car l'allantochorion est simplement apposé sur l'endomètre (Chavatte-Palmer et Tarrade, 2016). Ainsi, entre 5 et 6 couches cellulaires séparent le sang maternel du sang fœtal (en fonction de la position du vaisseau fœtal).

3.3.1.4.1. Structure du placenta définitif

L'allantochorion mature est composé de (Figures A.38, A.39, A.40 et A.41) :

L'**allantoïde**, qui a fusionné avec le chorion. L'allantoïde est composé d'un épithélium en position fœtale et d'un tissu conjonctif lâche hautement vascularisé (mésoderme allantoidien) (Steven, 1982). Le **chorion** est composé d'un tissu conjonctif serré vascularisé, d'un épithélium pseudostratifié, le **trophoblaste histotrophe**, situé dans les aréoles, spécialisé dans l'absorption des sécrétions exocrines des glandes utérines (nutrition histotrophe) et de la partie fœtale des **microcotylédons** qui vient s'insérer dans les cavités de l'utérus maternel. Chaque microcotyledon est alimenté par une artériole importante du côté maternel et une veinule fœtale équivalente du côté fœtal (Steven et Samuel, 1975; Steven, 1982). Les microcotylédons maximisent l'aire de contact microscopique entre les épithéliums maternels et fœtaux pour l'échange de nutriments et de déchets. L'aire d'échange fœto-maternelle est une nouvelle fois augmentée par les villosités membranaires des épithéliums qui recouvrent les microcotylédons, le **trophoblaste haemotrophe** et de l'épithélium endométrial (Samuel *et al.*, 1976).

A terme, la structure placentaire ne serait pas organisée de la même manière en fonction des zones utérines. Ainsi, la hauteur des villosités serait moins importante à l'extrémité de la corne gestante associée avec une épaisseur plus importante de vaisseaux allantoidiens qu'au niveau de la corne non gestante ou du corps du placenta (Oikawa *et al.*, 1990). Une étude récente a montré que les villosités au niveau de la corne gestante étaient moins volumineuses que les villosités de la corne non gestante et du corps du placenta, avec moins de trophoblaste haemotrophe (Meirelles *et al.*, 2017). De plus, le volume des vaisseaux des microcotylédons était plus important au niveau du corps que des deux cornes dans cette étude (Meirelles *et al.*, 2017) (Figure A.42).

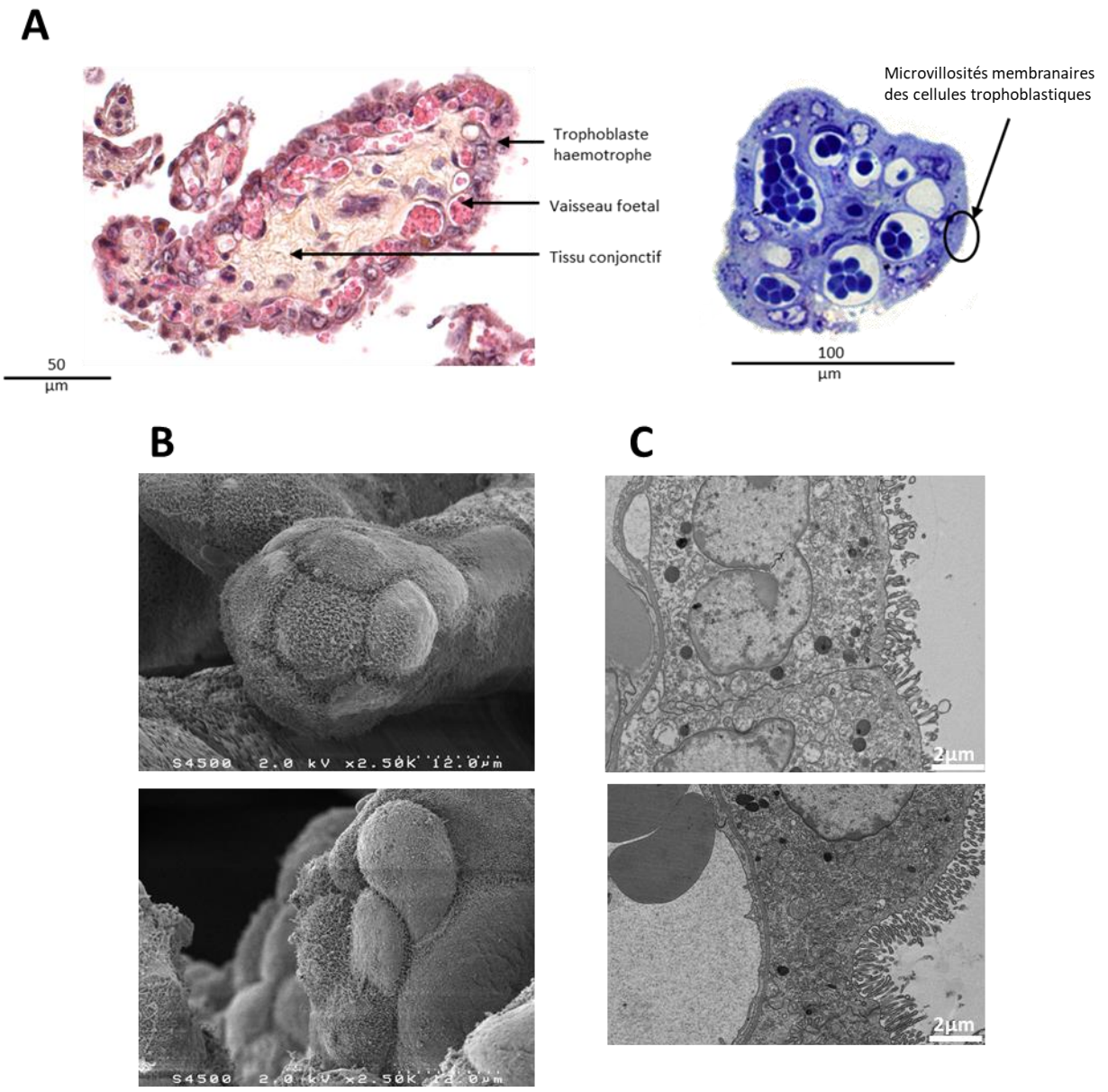


Figure A.40. Structure des microcotylédons à terme

A. Coupe transversale de microcotylédon à terme, coloration hématoxyline-éosine-saffran (7µm d'épaisseur) et bleu de toluidine (1µm d'épaisseur). B. Microvillosités observées au microscope électronique à balayage, à noter les villosités membranaires à la surface des cellules trophoblastiques (*Auteurs: Josiane Aïoun et Audrey Geeverding).* C. Coupes transversales de trophoblaste haemotrophe à terme observées au microscope électronique à transmission (Auteurs: Josiane Aïoun et Audrey Geeverding).

3.3.1.4.2. Fonction du placenta définitif

Le placenta intervient dans le transfert de gaz et de nutriments (directement depuis le sang maternel ou en produisant lui-même une partie des nutriments) vers le fœtus, il participe également à la régulation des différentes phases de la gestation et du développement fœtal en produisant des hormones et dans la protection du fœtus d'un rejet immunitaire de la mère.

Les **échanges gazeux** entre la mère et le fœtus sont réalisés par diffusion passive. L'O_2 et le CO_2 diffusent facilement au travers de l'interface placentaire, depuis la mère vers le fœtus pour l'oxygène et depuis le fœtus vers la mère pour le dioxyde de carbone (Longo, 2011). Cette diffusion dépend du gradient de concentration entre les compartiments maternel et fœtal, de la surface d'échange et de la perméabilité du placenta. Les échanges dépendent également de la qualité des flux sanguins et de la pression artérielle (Desforges et Sibley, 2010).

Le placenta est impliqué dans les **transferts de nutriments** tels que le transport de glucose, d'acides aminés et d'acides gras, ainsi que dans les échanges d'ion (Desforges et Sibley, 2010). Chez le cheval, le transporteur de glucose GLUT1 (codé par *SLC2A1*) est exprimé uniquement au niveau de la membrane basolatérale du trophoblaste haemotrophe, des cellules épithéliales utérines et dans les membranes des capillaires fœtaux. Il est absent du trophoblaste histotrophe. Le transporteur GLUT3 est exprimé au niveau de la membrane apicale (en regard de l'épithélium endométrial) des cellules du trophoblaste haemotrophe (Wooding *et al.*, 2000). De plus, le placenta équin est plus perméable au glucose que les placentas bovins et ovins mais moins que le placenta humain (Milner, 1984). Le métabolisme fœtal est en effet très dépendant du glucose entre la moitié et la fin de gestation (Fowden *et al.*, 2000b). Le transport calcique *via* la 9kDa calcium binding protein (9CBP) est réalisé depuis les glandes utérines au travers du trophoblaste histotrophe (Wooding *et al.*, 2000).

Le placenta a également une **fonction métabolique**, pour la fourniture de sa propre énergie mais également pour synthétiser des nutriments supplémentaires pour le fœtus. Le placenta est capable de produire du lactate et du fructose à partir du glucose maternel (Fowden *et al.*, 2000a) mais également d'utiliser les acides aminés (Silver *et al.*, 1994) ainsi que les lipides (Stammers *et al.*, 1988, 1994) comme substrats métaboliques. Le lactate, le fructose et les acides aminés ne semblent pas être utilisés majoritairement par les tissus utéro-placentaires en milieu et fin de gestation chez le cheval (Fowden *et al.*, 2000a). Le placenta équin serait perméable aux acides gras, ils seraient donc utilisés en majorité comme source d'énergie par le placenta, en particulier en fin de gestation (Fowden *et al.*, 2000a).

Le placenta équin participe à la **synthèse d'hormones** stéroïdes (Chavatte *et al.*, 1995, 1997; Conley, 2016; Legacki *et al.*, 2016) et polypeptidiques telles que l'eCG et certains facteurs de croissance

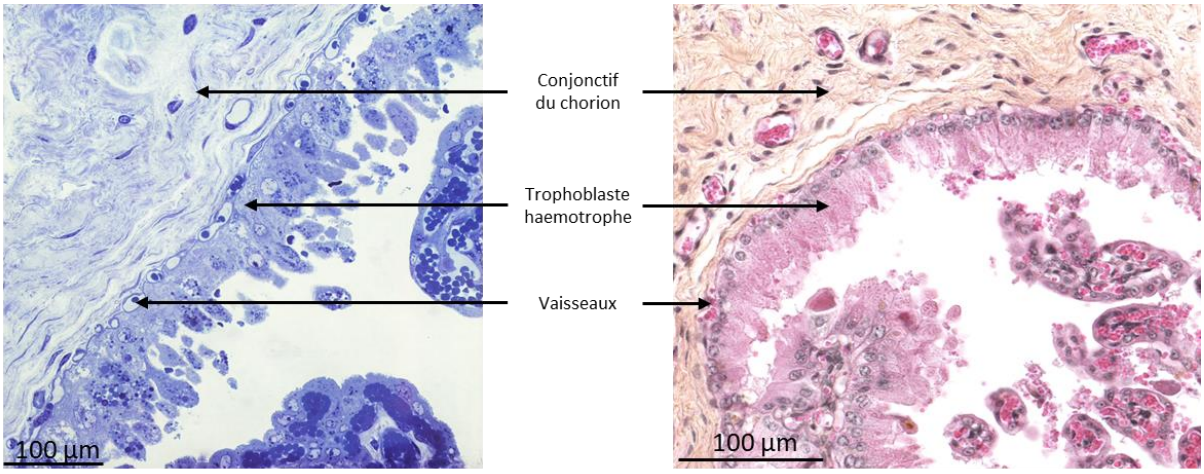


Figure 41. Structure du trophoblaste histotrophe à terme

Coupe transversale de placenta à terme , coloration hématoxyline-éosine-saffran (7µm d'épaisseur) et bleu de toluidine (1µm d'épaisseur). Le trophoblaste histotrophe longeant les aréoles est de type pseudo-stratifié.

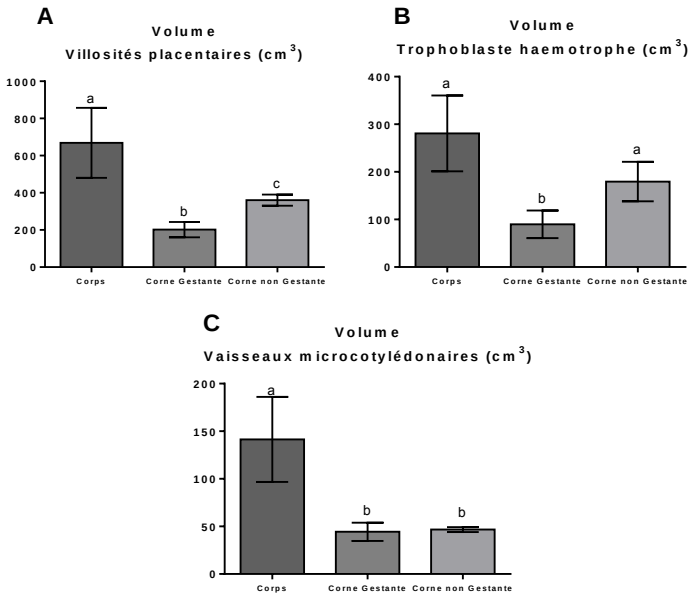


Figure A.42. Volume des différents composants placentaires à terme

D'après Meirelles et al., 2017

Les auteurs ne comparent pas directement dans leur article ces différences bien qu'ils les aient mesurées. Ainsi, les graphiques et statistiques (t-test) ici présents ont été réalisés à partir des données fournies dans les tableaux de l'article.

(Lennard *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 2017). Chez l'homme, les rongeurs, les félins, les ovins, les bovins les lapins et les porcins, le placenta produit également de la leptine qui intervient dans l'invasion trophoblastique, l'angiogenèse et la régulation de la production de progestérone, d'hCG (human CG) et d'œstradiol mais la production de cette hormone par le placenta n'a pas été montrée chez le cheval (Masuzaki *et al.*, 1997; Ashworth *et al.*, 2000; Keelan *et al.*, 2004; Dall'Aglio *et al.*, 2012; Kirat *et al.*, 2015).

3.3.1.5. Développement embryonnaire et fœtal

Brièvement, le cœur primitif fonctionnel est visible à 20 jours de gestation (Allen et Wilsher, 2009). Au 35ème jpo, l'embryon a terminé l'essentiel de son organogenèse et présente des bourgeons antérieurs et postérieurs qui deviendront les membres (Allen et Wilsher, 2009; Franciolli *et al.*, 2011). La délimitation temporelle pour l'appellation fœtus chez le cheval est fixée à 40 jours (Allen et Wilsher, 2009).

Les cellules acineuses et β du pancréas sont visibles dès 50 jpo (Rodrigues *et al.*, 2014). Cependant, le fœtus n'est capable de produire de l'insuline en réponse à la stimulation du glucose qu'à partir de 260 jours de gestation (Fowden *et al.*, 1980, 2005).

Le foie est complètement formé à 40 jours de gestation (Franciolli *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014). A 100 jpo, le foie est un site actif de l'hématopoïèse (Battista *et al.*, 2014). Cependant, aucune étude ne semble avoir été réalisée sur la période à laquelle le foie commence à être capable de produire du glucose chez le cheval.

Les chondrocytes et chondroblastes sont observables dès 45 jpo (Barreto *et al.*, 2016). A 35 jpo, l'ossification a commencé (Acker *et al.*, 2001) et à 60 jpo, les zones d'ossification du crâne, des vertèbres, des côtes et des membres sont clairement visibles (Franciolli *et al.*, 2011). Le tissu musculaire se différencie de 30 à 65 jpo et à partir de 75 jpo, les muscles commencent à s'organiser en différents groupes (Barreto *et al.*, 2016).

Les gonades fœtales croissent rapidement et atteignent un pic entre les 6èmes et 8èmes mois de gestation où elles atteignent le poids des gonades adultes avant de régresser (Cole et Hart, 1933; Sakai, 1955). Les ovaires sont visibles à 25 jpo, contenant des follicules primordiaux et des cellules primordiales non organisées sans distinction apparente entre les couches corticales et médullaires (Franciolli *et al.*, 2011). Les études réalisées sur le développement testiculaire précoce sont anciennes et ne sont pas disponibles. Il a été montré que la migration inguinale des testicules se déroule tardivement, vers environ 270 jours de gestation (Bergin *et al.*, 1970).

Ainsi, si l'organogenèse se déroule durant la première partie de gestation, la maturation du pancréas se déroule plus tard, en fin de gestation. La croissance osseuse s'étale sur la majeure partie de la

gestation. Le développement des gonades débute précocement et s'étale également sur la majeure partie de la gestation.

3.3.2. Adaptations placentaires et environnement maternel

Du fait de son rôle à l'interface fœto-maternelle et de son caractère transitoire et évolutif, le placenta est capable de s'adapter aux demandes du fœtus mais également aux changements d'environnement maternel. Ainsi, en réponse aux modifications de l'environnement maternel, la structure et la fonction du placenta changent, influençant l'apport de nutriment et d'oxygène ainsi que la production d'hormones placentaires et leur délivrance au fœtus (Jansson et Powell, 2007). Le placenta est donc considéré comme un « senseur » de l'environnement fœto-maternel (Jansson et Powell, 2006) et son rôle dans le contrôle de l'environnement fœtal le conduit à être l'agent programmateur de la croissance fœtale et donc un agent important du concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies (Fowden *et al.*, 2008).

Ce chapitre se concentrera principalement sur l'espèce équine, avec, quand les données ne sont pas disponibles dans cette espèce, une ouverture vers les animaux de rente ou l'homme.

3.3.2.1. Taille de la jument et surface placentaire

Le placenta équin étant diffus, sa taille est fortement corrélée avec la taille de l'utérus et donc de la jument. Ainsi le poids de naissance du poulain est fortement corrélé au poids et à la surface du placenta et donc au poids de la jument (Allen *et al.*, 2002b). La taille du placenta conditionne la surface d'échange macroscopique entre la jument et le fœtus.

Ainsi, les placentas des poulains croisés Shire x Shetland étaient plus légers pour les poulains portés par des juments Shetland que pour les poulains portés par des juments Shire (Walton et Hammond, 1938).

De plus, les placentas des embryons poneys Welsh transférés dans des juments Pur-sang Anglais étaient plus lourds et plus étendus que les placentas des poneys témoins mais moins lourds et mois étendus que ceux des Pur-sang Anglais témoins. Inversement, les placentas des embryons Pur-sang Anglais portés par des ponettes Welsh étaient plus légers et moins étendus que ceux des Pur-sang Anglais témoins (Allen *et al.*, 2002b). Ces résultats montrent l'influence réciproque du génotype fœtal et de l'environnement maternel sur le développement macroscopique du placenta, les placentas des petits poulains n'étant pas capables de grandir autant que les placentas des grands individus dans un environnement luxueux.

Associés à ces changements de surface macroscopique, la surface des microcotylédons était augmentée dans les placentas de poneys Welsh portés par des juments Pur-sang Anglais par rapport

Tableau 14. Résumé des études réalisées sur l'effet de la surnutrition chez la brebis sur la structure et la fonction placentaire

Surnutrition	Période de surnutrition	Fonction	Age	Phénotype	Source
Brebis					
Ad libitum	100 premiers jours de gestation	Biométrie	103 jours de gestation	↘ Poids des cotylédons	Da Silva *et al.*, 2003
214%	Après transfert d'embryon à 4 jours de gestation	Biométrie	81 jours de gestation	= Poids des cotylédons	Redmer *et al.*, 2005
		Vascularisation		↘ Expression des gènes impliqués dans la vascularisation	
150%	Dès 60 jours avant l'insémination	Biométrie	75 jours de gestation	= Poids des cotylédons ↗ Efficacité placentaire	Ma *et al.*, 2010 Zhu *et al.*, 2009 Zhu *et al.*, 2010
			135 jours de gestation	↘ Poids des cotylédons ↗ Efficacité placentaire	
		Vascularisation	75 jours de gestation	↗ Diamètre artérioles des cotylédons ↘ Expression des gènes impliqués dans la vascularisation ↘ Densité de surface vascularisée des cotylédons	
			135 jours de gestation	= Diamètre artérioles des cotylédons = Expression des gènes impliqués dans la vascularisation	
		Transfert de nutriments	75 jours de gestation	↗ Expression des gènes et protéines des transporteurs de lipides ↘ Expression et phosphorylation des protéines kinase des voies de signalisation (mTOR, ERK, AMPK) ↘ Voie de signalisation de l'insuline	
			135 jours de gestation	↗ Expression des gènes et protéines des transporteurs de lipides	
200%	Après transfert d'embryon à 4 jours de gestation	Biométrie	Naissance	↘ Poids des cotylédons	Wallace *et al.*, 2017
Vache					
190%	Dès 60 jours de gestation	Biométrie	268 jours de gestation	↘ Poids du placenta ↘ Surface des placentomes	Rotta et al., 2015
		Vascularisation	De 139 à 268 jours de gestation	↘ Expression des gènes impliqués dans la vascularisation	

aux poneys témoins et réduite dans les placentas des Pur-sang Anglais portés par des ponettes par rapport aux chevaux témoins (Allen *et al.*, 2002b).

La taille de la jument a donc également une influence importante sur la régulation de la surface d'échange microscopique entre la mère et le fœtus et conditionne donc également la croissance *in utero* du poulain. La fonction de transfert n'a pas été étudiée dans ces différentes études, alors que la régulation des différents transporteurs de nutriments ou des facteurs de croissance fœtaux joue un rôle important dans la régulation de la croissance fœtale.

La taille de la jument porteuse a donc une influence sur la biométrie placentaire mais également sur la surface d'échanges materno-fœtale microscopique. Ces modifications de la structure placentaire influencent directement la croissance *in utero* du poulain.

3.3.2.2. Modifications nutritionnelles maternelles

3.3.2.2.1. Surnutrition maternelle et supplémentation en céréales

Chez la brebis, la surnutrition maternelle diminue le poids du placenta et la vascularisation placentaire, augmente le transport lipidique placentaire et diminue la voie de signalisation de l'insuline durant la gestation (Tableau 14) (Redmer *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009, 2010; Ma *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2017). De plus, la régulation de la vascularisation placentaire évolue en fonction du stade de gestation : élevée à mi-gestation, elle diminue en fin de gestation afin de protéger le fœtus contre une vascularisation placentaire excessive et donc une macrosomie à la naissance (Ma *et al.*, 2010).

Chez la vache également, la surnutrition maternelle en gestation diminue le poids du placenta et la surface des placentomes en fin de gestation et diminue l'expression des gènes impliqués dans la vascularisation durant la 2ème moitié de gestation (Rotta *et al.*, 2015).

La surnutrition des juments à partir du 2ème mois de gestation (150% des recommandations NRC 1978) n'a pas modifié le poids des placentas à la naissance (Kubiak *et al.*, 1988).

La supplémentation en céréales à partir du 6ème mois de gestation ne modifiait pas le poids du placenta, la taille des cellules (calculée en divisant la quantité de protéines par la quantité d'ADN placentaire) ni le nombre de cellules (calculé en divisant la quantité d'ADN placentaire par le poids du placenta) placentaires. De plus, la supplémentation en céréales ne modifiait pas l'efficacité placentaire (Karren *et al.*, 2010).

3.3.2.2.2. Sous-nutrition maternelle

Chez la brebis, la sous-nutrition maternelle ne diminue pas toujours le poids du placenta et des cotylédons (Tableau 15) (Parr *et al.*, 1986; Heasman *et al.*, 1998; Steyn *et al.*, 2001; Vonnahme *et al.*,

Tableau 15. Résumé des études réalisées sur l'effet de la sous-nutrition chez la brebis sur le développement post-natal de la descendance

Sous-nutrition	Période de sous-nutrition	Fonction	Age	Phénotype	Source
Brebis					
60%	De 30 à 80 jours de gestation	Biométrie	80 jours de gestation	= Poids placentaire ↘ Poids des cotylédons ↘ Nombre de cotylédons	Heasman *et al.*, 1998
70%	Dès 22 jours de gestation	Biométrie	135 jours de gestation	↘ Poids des cotylédons	Osgerby *et al.*, 2004
			90 et 135 jours de gestation	↘ Expression génique d'*IGFBP6*	
50%	Dès 28 jours de gestation	Biométrie	78 jours de gestation	= Poids des cotylédons = Surface des cotylédons ↘ Efficacité placentaire	Vonnahme *et al.*, 2003
60%	Dès 50 jours de gestation	Vascularisation	90 et 130 jours de gestation	↗ Expression des gènes impliqués dans la vascularisation	Redmer *et al.*, 2004
50%	De 1 à 35 jours de gestation	Biométrie	90 jours de gestation	= Poids des cotylédons	Parr *et al.*, 1986
85%	De -14 à 70 jours de gestation	Biométrie	130 jours de gestation	= Poids placentaire ↗ Tissu fœtal dans les placentomes	Steyn *et al.*, 2001
Vaches					
68%	De 30 à 125 jours de gestation	Biométrie	125 jours de gestation	↘ Poids des cotylédons	Long *et al.*, 2009 Vonnhame *et al.*, 2007
			245 jours de gestation	↘ Poids des cotylédons ↘ Nombre de cotylédons ↗ Surface moyenne des placentomes	
		Vascularisation	250 jours de gestation	↘ Surface capillaire placentaire ↘ Nombre de capillaires placentaires = Expression des gènes impliqués dans la vascularisation	

2003; Osgerby *et al.*, 2004; Redmer *et al.*, 2004). Cependant les brebis sous-nourries présentent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la vascularisation (Redmer *et al.*, 2004).
Chez la vache, la sous nutrition durant la première moitié de gestation diminuait le poids des cotylédons à mi-gestation et en fin de gestation ainsi que la surface de vascularisation placentaire en fin de gestation (Vonnahme *et al.*, 2007; Long *et al.*, 2009).

Chez le cheval, l'effet de sous-nutrition maternelle sur la structure placentaire n'a été étudié que dans le cas où les juments cessaient de s'alimenter après avoir été infectées par *Streptococcus equi* (Wilsher et Allen, 2006). Ainsi les juments sous-nourries ont produit un placenta de même poids à la naissance mais de surface et de volume réduits. De plus, malgré le fait qu'elles présentaient une augmentation de la surface d'échange microscopique (surface des microcotylédons), l'efficacité placentaire était réduite par rapport aux juments non infectées. Cela signifiait que malgré une adaptation structurale du placenta, les échanges fœto-maternels étaient restreints, ce qui explique le plus faible poids de naissance des poulains.

3.3.2.2.3. Supplémentation en minéraux et acides aminés

3.3.2.2.3.1. Supplémentation en sélénium

La supplémentation en sélénium ne modifiait pas le poids du placenta à terme. Cependant, les juments ayant reçu du sélénium à partir du 6ème mois de gestation ont produit des placentas dont les cellules étaient de taille réduite (calculée en divisant la quantité de protéines par la quantité d'ADN placentaire). Ainsi, comme les poulains n'étaient pas de poids différent à la naissance, l'efficacité cellulaire était augmentée dans les placentas des juments supplémentées en sélénium (Karren *et al.*, 2010).

3.3.2.2.3.2. Supplémentation en arginine

Chez la jument, une supplémentation en arginine du 21ème jour avant le poulinage théorique jusqu'à 7 jours après le poulinage augmentait le flux sanguin artériel de l'artère utérine de la corne non gestante durant la fin de la gestation cependant sans différence de poids de placenta à terme (Mortensen *et al.*, 2011).

En conclusion, l'effet de l'alimentation maternelle sur le développement placentaire chez le cheval a été très peu étudié. Or, comme il a été montré chez la brebis et la vache, la nutrition maternelle peut influencer la vascularisation placentaire ainsi que le transfert de nutriments vers le fœtus.

3.3.2.3. Obésité maternelle et pathologies métaboliques

3.3.2.3.1. Chez la femme

Tableau 16. Poids placentaire à terme en fonction de la parité maternelle

Wilsher et Allen, (2003) ont comparé un lot de juments primipares et un lot de juments multipares (a) mais également les poulains de mêmes juments deux années de suite : primipares la première année et donc multipares la deuxième année (b). De plus, Elliott *et al*., (2009) ont pesé l'allantochorion, l'amnios et le cordon, alors que les autres auteurs n'ont pesé que l'allantochorion.

Race	Primipares (kg)	Multipares (kg)	Source
Pur-sang Anglais	5.7 ± 1.3	6.5 ± 1.4	Elliott *et al*., (2009)
		6.7 ± 1.6	
		6.4 ± 1.2	
Brazilian sport horse Mangalarga Paulista	3.4 ± 0.1	3.9 ± 0.4	Mereilles *et al*., (2017)
		3.8 ± 0.2	
Pur-sang Anglais[a]	3.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1	Wilsher et Allen, (2003)
		4.3 ±0.3	
		4.2 ± 0.1	
Pur-sang Anglais[b]	3.7 ± 0.2	4.1 ± 0.2	Wilsher et Allen, (2003)

L'effet de l'obésité maternelle sur le développement placentaire a été particulièrement étudié chez l'homme tandis qu'aucune étude n'a été publiée dans l'espèce équine. Ainsi dans ce paragraphe seront présentées quelques études réalisées dans l'espèce humaine.

Les placentas des femmes obèses ont une épaisseur plus importante et une efficacité réduite (Mando *et al.*, 2016). De plus, chez la femme obèse, la quantité de triglycérides placentaires, ainsi que l'expression et l'activité des transporteurs de lipides sont augmentés (Dubé *et al.*, 2012; Hirschmugl *et al.*, 2016; Lager *et al.*, 2016) mais l'activité et l'expression des transporteurs d'acides aminés ainsi que l'expression du récepteur de la leptine sont diminuées dans les placentas (Farley *et al.*, 2010). Ces altérations du transport de nutriments seraient liées à des concentrations élevées en insuline et leptine et basses en adiponectines dans les cas d'obésité maternelle. Cela conduirait à une croissance fœtale plus importante et une augmentation des dépôts adipeux (Gallo *et al.*, 2016; Howell et Powell, 2017). De plus, les placentas des femmes obèses sont plus résistants à la leptine que les placentas des femmes non obèses (Farley *et al.*, 2010).

Les placentas des femmes obèses présentent une réduction de l'expression des gènes impliqués dans la vascularisation placentaire, ainsi qu'une perturbation de la mise en place des villosités qui se traduit par une angiogenèse non branchée (Dubova *et al.*, 2011). De plus, une augmentation de l'épaisseur musculaire est observée autour des vaisseaux des placentas des femmes obèses (Roberts *et al.*, 2011). Enfin, l'inflammation chronique bas-grade chez les femmes obèses avant la gestation initie une cascade d'évènements qui rendent l'environnement utérin inflammé (Myatt et Maloyan, 2016). Ainsi l'obésité maternelle augmente la concentration en cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration des cellules immunitaires dans les placentas (Challier *et al.*, 2008; Roberts et Murray, 2014; Myatt et Maloyan, 2016), qui conduit à l'altération du transport des acides gras libres jusqu'à la circulation fœtale. De plus, l'obésité maternelle conduit à une diminution de la respiration mitochondriale (Prince *et al.*, 2017) et donc une génération d'ATP par le placenta moins importante qui n'est pas compensée par une augmentation de la glycolyse (Maloyan *et al.*, 2016).

3.3.2.3.2. Chez la jument

Chez le cheval, la fourbure est une pathologie métabolique associée à une adiposité importante entrainant un basculement de la 3ème phalange et donc des boiteries (**voir chapitre 4**). Cette pathologie est également associée à de l'hypertension et des changements dans l'endothélium vasculaire (Garner *et al.*, 1977; Eades *et al.*, 2007; Pazinato *et al.*, 2017). Les juments atteintes de fourbure en gestation avaient une durée de gestation plus courte associée à une diminution du poids de naissance du poulain et du placenta. De plus, leurs placentas présentaient un épaississement de l'épaisseur vasculaire, ainsi qu'une augmentation de la fibrose dans les microcotylédons (Pazinato *et al.*, 2017).

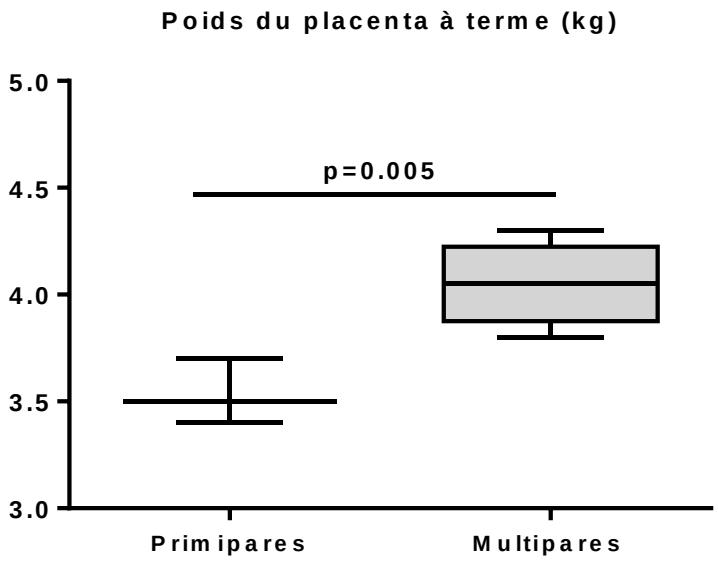


Figure A.43. Poids des placentas à terme en fonction de la parité maternelle
D'après Wilsher et Allen, 2003 ; Meirelles et al., 2017

3.3.2.4. Parité et âge

Les placentas des juments primipares sont plus légers, moins volumineux et ont une surface moins importante que les placentas des juments multipares (Tableau 16 et Figure A.43) (Wilsher et Allen, 2003; Elliott *et al.*, 2009; Meirelles *et al.*, 2017). De plus, les placentas des juments primipares présentaient une surface microscopique d'échange (surface des microcotylédons) inférieure aux juments multipares malgré une efficacité placentaire augmentée (Wilsher et Allen, 2003; Meirelles *et al.*, 2017). Enfin, le volume total du trophoblaste haemotrophe était diminué dans la corne non gestante et le corps des placentas des juments primipares par rapport aux juments multipares, associé à une diminution de la longueur des microcotylédons dans les 3 zones des placentas des juments primipares (Meirelles *et al.*, 2017).

Suivant les études, le poids du placenta à terme augmente ou non avec l'âge de la jument (Wilsher et Allen, 2003; Elliott *et al.*, 2009; Meirelles *et al.*, 2017). Les jeunes juments multipares (5-9 ans) produisaient des placentas avec une surface des microcotylédons plus importante que les juments plus âgées (10-15 ans) et particulièrement que les juments âgées de plus de 16 ans (Wilsher et Allen, 2003). De plus, les juments âgées de 4 à 8 ans présentaient une diminution du volume total de microcotylédons, du volume total des vaisseaux allantoidiens, ainsi que de la hauteur des microcotylédons dans le corps du placenta par rapport aux juments plus âgées sans modification de l'efficacité placentaire (Meirelles *et al.*, 2017).

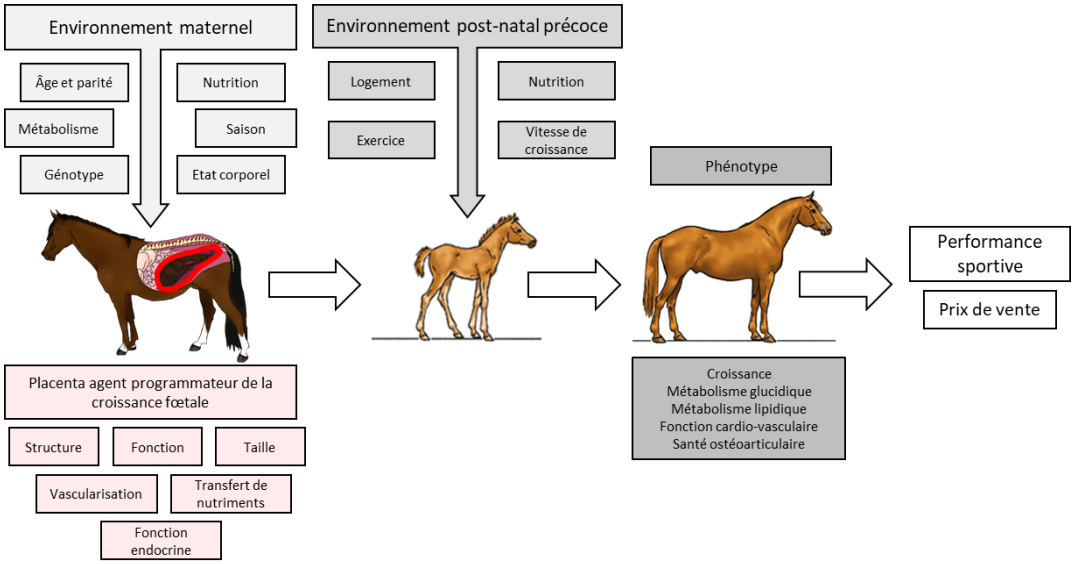


Figure A.44. Origines Développementales de la Santé et des Maladies chez l'espèce équine

En résumé (Figure A.44)

L'environnement précoce de l'individu peut moduler son potentiel génétique, c'est le concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies. L'environnement précoce est découpé en fenêtres de susceptibilité (de la conception à la vie de jeune adulte) pendant lesquelles la plasticité de l'individu est importante. Ses risques de développer des pathologies à l'âge adulte pourront donc être augmentés ou réduits en fonction de son environnement précoce et de l'adéquation de cet environnement avec la vie adulte. Le placenta, à l'interface entre la mère et le fœtus a la capacité de réguler les échanges materno-fœtaux et donc de moduler l'environnement fœtal et donc son développement.

Dans le cas de l'espèce équine, les études réalisées ont montré qu'il est important de prendre en compte :

-Le génotype maternel et l'interaction génotype maternel x génotype fœtal dans le cas d'un transfert d'embryon

-La nutrition maternelle

-L'âge et la parité maternelle

-La saison de naissance

Ces facteurs peuvent influencer la croissance, les métabolismes glucidiques et lipidiques, ainsi que le développement de pathologies ostéoarticulaires telles que l'ostéochondrose. Ces altérations de développement peuvent conduire à une diminution de la performance et/ou du prix de vente de l'animal.

Tableau 17. Prévalence d'obésité au sein de la filière équine en fonction des pays, des races, des études et de la définition du surpoids et de l'obésité (ramené à une échelle de 0 à 5 pour pouvoir comparer les différentes études entre elles)

Pays	Race	Nombre d'animaux	Définition surpoids et obésité	Prévalence	Examinateur	Source
Grande-Bretagne	Chevaux de selle et de trait et poneys	96	Obèse si NE>3,75	41,76%	Chercheurs	Giles *et al*., 2014
Australie	Chevaux et poneys	229	Obèse si NE>3,75	23,1%	Chercheurs	Potter et al., 2016
Danemark	Chevaux Islandais	254	Surpoids si 3,75<NE<4,4 Obèse si NE>4,4	13,8% 10,2%	Chercheurs	Jensen *et al*., 2016
Grande-Bretagne	Chevaux	319	Surpoids si 4<NE<5 Obésité si NE=5	35% 10%	Chercheurs	Wyse *et al*., 2008
Etats-Unis	Chevaux	300	Surpoids si 3,75<NE<4,4 Obésité si NE> 4,4	32% 18,7%	Chercheurs	Thatcher *et al*., 2012
Etats-Unis	Chevaux de trait	138	Surpoids si NE>3,75	42%	Chercheurs	Hansen *et al*., 2015
Etats-Unis	Chevaux de selle à l'exercice	89	Surpoids si NE>3,75	2%	Chercheurs	Hansen *et al*., 2015
Grande-Bretagne	Chevaux et poneys	103	Surpoids si NE>3,5	66%	Chercheurs	Wood *et al*., 2016
Grande-Bretagne	Chevaux et poneys	331	Surpoids si 3,12<NE<3,75 Gras si 3,75<NE<4,4 Obésité si NE> 4,4	41% 16% 5%	Chercheurs	Harker *et al*., 2011
Nouvelle-Zélande	Poneys	240	Surpoids si NE>3,75	47%	Chercheurs	Fernandes *et al*., 2015
Angleterre	Chevaux et poneys	792	Surpoids si 4<NE<5 Obèse si NE=5	29,3% 1,9%	Propriétaire	Ireland *et al*., 2013
Grande-Bretagne	Chevaux	158	Surpoids si NE>4	17,7%	Propriétaire	Stephenson *et al*., 2011
Grande-Bretagne	Chevaux et poneys	103	Surpoids si NE>3,5	55%	Propriétaire	Wood *et al.,* (2016)
Île du prince Edouard	Chevaux	290	Surpoids si NE>3,75 Obèse si NE>4,5	14% 1,2%	Vétérinaire	Christie *et al*., 2006
Canada	Chevaux de selle	50	Surpoids si NE>3,5	72%	Vétérinaire	Honoré et Uhlinger, 1994
Grande-Bretagne	Vieux chevaux ≥ 15 ans	200	Surpoids si NE>3	26%	Vétérinaire	Ireland *et al*., 2012
Grande-Bretagne	Chevaux et poneys	792	Surpoids si NE>4	31,2%	Vétérinaire	Robin *et al*., 2015
Pays-Bas	Chevaux	2939	Surpoids si 4<NE<5 Obésité si NE=5	18% 0,8%	Vétérinaire	Visser *et al*., 2014

4. Pathologies métaboliques au sein de la filière équine

4.1. Obésité

4.1.1. Définition

D'après l'OMS, l'obésité est définie comme *« une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé* » (World Health Organization, 2000). Chez le cheval, il n'existe pas de définition officielle de l'obésité. Bien qu'il ait été remarqué que les chevaux obèses perdent la saisonnalité d'évolution de l'état corporel associée aux évolutions d'offre nutritionnelle (Giles *et al.*, 2012, 2014).

4.1.2. Prévalence de l'obésité au sein de la filière équine

Le tableau 17 résume toutes les enquêtes réalisées au sein de la filière équine. La proportion de surpoids et d'obésité au sein de la filière varie de 2% à 72%, en fonction des pays, de la définition du surpoids et de l'obésité, des races et de l'utilisation des chevaux (Honoré et Uhlinger, 1994; Christie *et al.*, 2006; Wyse *et al.*, 2008; Stephenson *et al.*, 2011; Harker *et al.*, 2011; Thatcher *et al.*, 2012; Ireland *et al.*, 2012, 2013; Visser *et al.*, 2014; Giles *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2015; Robin *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2015; Wood *et al.*, 2016; Potter *et al.*, 2016). Bien que variable, la prévalence d'obésité est néanmoins élevée et peut être considérée à l'heure actuelle comme un problème majeur de santé publique au sein de la filière.

Les raisons de ces hautes prévalences sont multiples :

Une nutrition non adaptée (pas d'accès au foin par exemple) est associée à un risque plus élevé pour le cheval d'être en surpoids ou obèse (Thatcher *et al.*, 2012; Hitchens *et al.*, 2016; Potter *et al.*, 2016). Comme décrit dans le premier paragraphe, les propriétaires de chevaux n'ont pas de bonnes connaissances des besoins nutritionnels de leurs animaux. **La distribution de concentrés** augmente le risque pour les chevaux d'être en surpoids ou obèses (Thatcher *et al.*, 2012; Giles *et al.*, 2014; Visser *et al.*, 2014).

L'utilisation du cheval : les chevaux utilisés pour le loisir sont plus à risque d'être en surpoids ou obèse que les chevaux d'instruction, d'élevage ou de compétition. Les chevaux en reproduction ont plus de chance d'être en surpoids ou obèses que les chevaux en compétition (Visser *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2015; Robin *et al.*, 2015).

La race : les poneys son plus à risque d'être en surpoids ou obèses que les chevaux de selle et surtout que les Pur-Sang Anglais (Pratt-Phillips *et al.*, 2010; Ireland *et al.*, 2013; Giles *et al.*, 2014, 2015; Visser *et al.*, 2014; Robin *et al.*, 2015; Potter *et al.*, 2016).

L'âge du cheval : les chevaux d'âge moyen (4 à 18 ans) sont plus à risques que les chevaux âgés (> 18 ans) et que les chevaux jeunes (<4 ans) (Thatcher *et al.*, 2012; Ireland *et al.*, 2013; Giles *et al.*, 2014; Visser *et al.*, 2014; Sanchez *et al.*, 2016).

La saison : comme présenté plus haut, le cheval est un animal pour qui l'état corporel évolue fortement en relation avec l'apport nutritionnel. Ainsi, les études réalisées à la fin du printemps et en été peuvent obtenir des prévalences de surpoids et d'obésité plus importants que les études réalisées à la fin de l'automne et en hiver (Christie *et al.*, 2006; Giles *et al.*, 2014, 2015; Fernandes *et al.*, 2015; Hitchens *et al.*, 2016).

L'exercice : un cheval faisant peu d'exercice a plus de risque d'être en surpoids ou obèse (Thatcher *et al.*, 2012).

Le fait que les **propriétaires de chevaux sous-estiment l'état corporel** de leurs animaux sans différence entre les professionnels et les amateurs (Honoré et Uhlinger, 1994; Wyse *et al.*, 2008; Stephenson *et al.*, 2011; Ireland *et al.*, 2012; Jensen *et al.*, 2015; Morrison *et al.*, 2015; Potter *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2016).

4.1.2.1. Les pathologies associées à l'obésité

Le **syndrome métabolique**, chez le cheval, regroupe une adiposité augmentée généralement ou dans des régions spécifiques (chignon, base de la queue, épaules, prépuce, glandes mammaires), résistance à l'insuline (hyperinsulinémie ou réponse anormale à un test de glucose), prédisposition aux fourbures. D'autres symptômes sont également reliés au syndrome métabolique tels qu'une hypertriglycéridémie ou une dyslipidémie, une hyperleptinémie, une hypertension artérielle, une altération du cycle reproductif chez la jument et une augmentation des marqueurs systémiques d'inflammation (Frank *et al.*, 2010).

Chez le cheval, il a été montré que les concentrations sériques et plasmatiques de leptine et d'insuline augmentaient avec la quantité de graisse corporelle (Buff *et al.*, 2002; Powell *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; Vick *et al.*, 2006; Pleasant *et al.*, 2013; Jansson *et al.*, 2016) tandis que la sensibilité à l'insuline diminuait, particulièrement chez les individus obèses (Hoffman *et al.*, 2003b; Vick *et al.*, 2007; Suagee *et al.*, 2013). De la même manière, la quantité plasmatique de la protéine de phase aigüe sérum amyloïde A (protéine produite par le foie dans le cas d'inflammation aigüe), d'IL1 et de TNFα augmentent avec la NE et avec la concentration d'insuline plasmatique (Vick *et al.*, 2007; Suagee *et al.*, 2013). Récemment, Bamford *et al* (2016) ont montré que ces observations dépendaient de

l'alimentation des chevaux, une alimentation riche en amidon entrainant ces associations tandis qu'un régime riche en lipides n'entrainait pas de diminution de la sensibilité à l'insuline ni d'augmentation de la concentration plasmatique de SAA, malgré une NE et une leptinémie équivalentes (Bamford *et al.*, 2016). De plus, la distribution de concentrés à des chevaux Islandais augmente leur concentration plasmatique d'insuline : pour chaque 1kg de concentré distribué, la concentration en insuline plasmatique augmente de de 0,26mUI/l (Jansson *et al.*, 2016).

La **fourbure** est une pathologie très handicapante qui se caractérise par la dégradation des lamelles de la surface interne du sabot qui normalement soutiennent la 3ème phalange qui bascule donc vers le bas. Ce basculement est associé avec une inflammation et un ischémie localisées (Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999). Le cheval éprouve alors des difficultés à se déplacer (boiteries ou refus de se déplacer). Cette pathologie est multifactorielle. Néanmoins, elle est associée avec une adiposité plus importante (Frank *et al.*, 2006, 2010; Menzies-Gow *et al.*, 2010).

4.1.2.2. Influence de l'état corporel sur les performances sportives

L'état corporel des chevaux de course (2,81 pour les Trotteurs Français, 2,44 pour les Pur-Sang Anglais), des chevaux d'endurance (2,3 en moyenne), de concours complet (entre 2,4 et 2,6) et des chevaux de sport (entre 3 et 3,5 chez le cheval de concours de saut d'obstacle international, une moyenne de 3 pour les chevaux de dressage) n'est pas le même (Lawrence *et al.*, 1992b; Sommaire, 2007; Burk et Williams, 2008; Martin *et al.*, 2008; Verhaar *et al.*, 2014). En effet, les chevaux de course, d'endurance et de concours complet ont besoin de porter peu de poids pour pouvoir courir plus vite et/ou plus longtemps, selon la littérature leur % de masse grasse oscille en moyenne entre 7,8% et 8,8% (Lawrence *et al.*, 1992b; Garlinghouse et Burrill, 1999; Kearns *et al.*, 2002b), contre de 8,24% à 10,3% de moyenne chez le cheval de sport (Martin *et al.*, 2008; Hervouet, 2012).

Hors pathologie, les trotteurs les plus gras courent moins vites que les trotteurs les moins gras sur 1600m (Kearns *et al.*, 2002c). De la même manière, en course d'endurance (241km en deux jours) les chevaux qui n'ont pu finir la course pour cause métabolique ou qui ont fini la course hors du top 10 étaient les chevaux les plus gras (Lawrence *et al.*, 1992b). Malheureusement, aucune étude n'a été réalisée pour les autres disciplines.

Ces résultats seraient associés au fait que le cheval plus gras, pour une même masse musculaire est plus lourd et donc doit bouger plus de poids. Cela entrainerait une augmentation de l'énergie nécessaire pour l'exercice, quelle que soit l'intensité de l'exercice (Kearns *et al.*, 2002d). Hors, en endurance, les chevaux les plus lourds sont ceux les plus à risque d'arrêter pour cause de boiterie (Garlinghouse et Burrill, 1999). De plus, le tissu adipeux ayant des propriétés d'isolation thermique 3

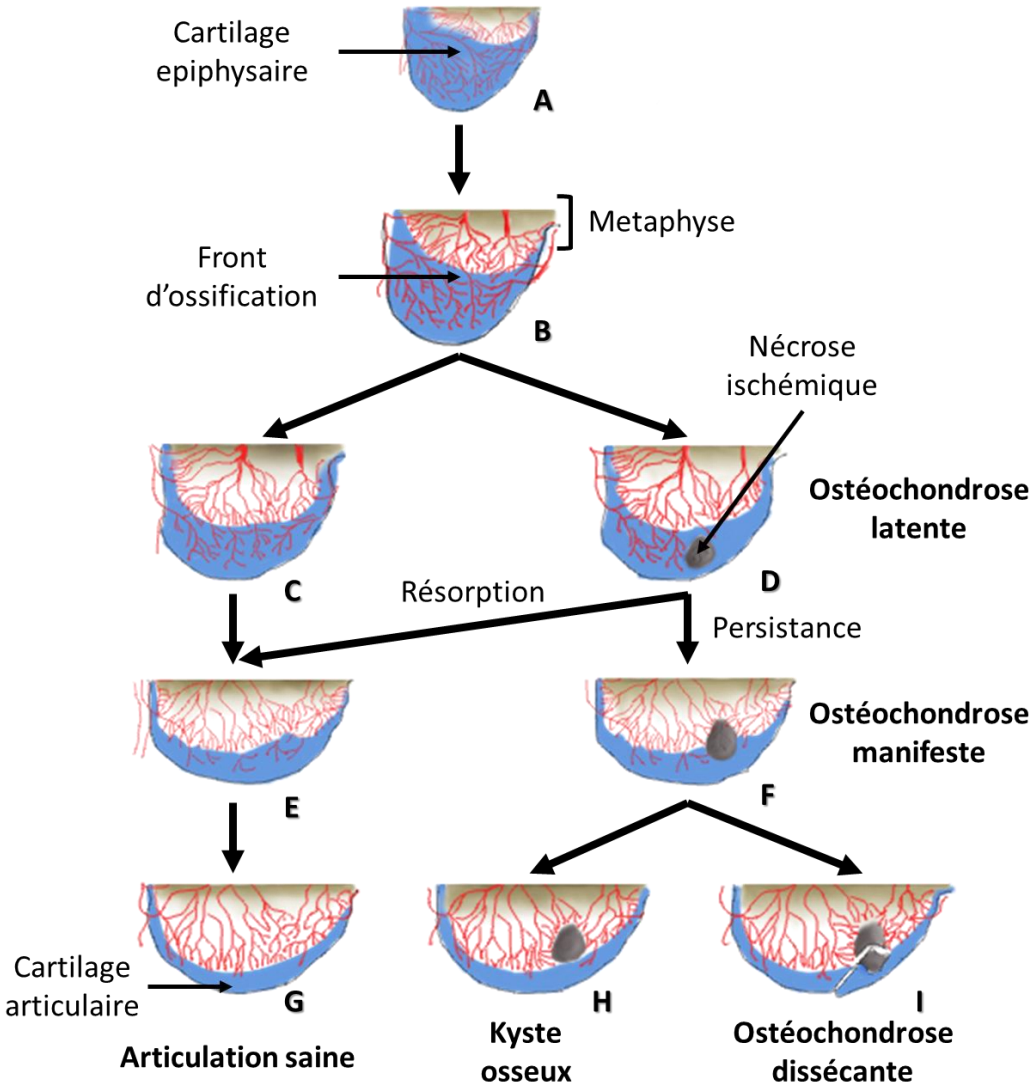


Figure A.45. Schéma représentatif de l'apparition et l'évolution d'une lésion d'ostéochondrose
Le cartilage epiphysaire est bien vascularisé *via* les canaux cartilagineux qui pénètrent le cartilage depuis le plexus perichondrial (A). Lorsque l'animal grandit et que le front d'ossification atteint le point de course du canal cartilagineux le plus proche de la métaphase, les vaisseaux de ce canal anastomosent avec les vaisseaux du front d'ossification (B). Par la suite, le cartilage epiphysaire est vascularisé par des canaux cartilagineux provenant des vaisseaux de la métaphase. Une interruption focale de ces vaisseaux peut causer une nécrose ischémique du cartilage (D) qui peut régresser (E) ou persister tandis que le front d'ossification avance autour (F). Cela peut conduire à la formation d'un kyste osseux sous-chondral (H) ou à la libération d'un fragment dans l'articulation (I). *D'après Ytrehus et al., (2007).*

fois supérieures aux autres tissus, son accumulation pourrait limiter les capacités de thermorégulation des chevaux les plus gras et donc leurs performances (Morgan, 1997).

4.2. Ostéochondrose

4.2.1. Définition et pathogenèse

L'ostéochondrose est une affection ostéoarticulaire juvénile commune des humains et des animaux domestiques et d'élevage (Ytrehus *et al.*, 2007; Denoix *et al.*, 2013). Chez le cheval, elle se développe avant l'âge d'un an et demi (Carlsten *et al.*, 1993a; Pagan, 1998; Dik et Enzerink, 1999; Jacquet *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2016).

Cette pathologie est décrite comme étant une perturbation du processus de différenciation enchondrale, causant une prédisposition à la formation de fragments dans les articulations des jeunes chevaux sans arthrose ou traumatisme préliminaire de l'articulation (Ytrehus *et al.*, 2007). La principale lésion de cette pathologie est un échec local de l'ossification enchondrale : la persistance des chondrocytes hypertrophiques entraine un échec de calcification de la matrice et de l'invasion vasculaire. La zone de jonction entre les tissus cartilagineux et osseux devient alors irrégulière et le cartilage persistant devient mou et donc plus fragile (Carlson *et al.*, 1995; Jeffcott et Henson, 1998; van Weeren, 2006; Ytrehus *et al.*, 2007; Douglas, 2011; Kinsley *et al.*, 2015; Olstad *et al.*, 2015).

La pathologie se découpe en 3 stades (Figure A.45) : Le **premier stade de développement** (ostéochondrose latente*)* correspond à des zones de nécrose ischémiques focales, confinées au cartilage de croissance sans s'étendre au cartilage articulaire ou à l'os enchondral (Ytrehus *et al.*, 2007; Olstad *et al.*, 2015). Chez les jeunes animaux, ces lésions peuvent régresser voire disparaître ou persister. Le **second stade** (ostéochondrose manifeste) correspond alors à un échec de l'ossification enchondrale. Cela peut conduire à des fissures dans le cartilage endommagé. Cette lésion est alors visible par radiographie (Ytrehus *et al.*, 2007). Le **troisième stade** (ostéochondrose dissécante) est l'extension de la fissure dans le cartilage et la libération partielle ou totale de fragments de cartilage endommagés dans l'articulation (Ytrehus *et al.*, 2007). En parallèle, l'ostéochondrose manifeste peut également progresser en la formation d'un kyste osseux sous-chondral. Une lésion d'ostéochondrose peut donner lieu à une infiltration du cartilage sous-jacent conduisant à la formation d'un kyste (Stromberg, 1979; Trotter et McIlwraith, 1981).

4.2.2. Etiologie et prévalence

Tableau 18. Prévalence d'ostéochondrose au sein de la filière équine en fonction des pays, des races, de l'âge et des études

L'ostéochondrose se développant principalement sur des sites cibles, sa prévalence est différente entre les articulations. Pour simplifier le tableau, la prévalence présentée est la prévalence totale correspondant au pourcentage d'animaux présentant au moins une lésion d'ostéochondrose.

Pays	Race	Nombre d'animaux	Âge	Prévalence	Source
Islande	Cheval Islandais	614	6 à 12 ans	0%	Björnsdóttir *et al*., (2000)
Islande et Norvège	Cheval Islandais	64	47 jours à 4 ans	0%	Strand et al., (2007)
Etats-Unis	Chevaux de trait	1135	1 mois à 27 ans	5%	Riley *et al*., (1998)
Etats-Unis	Pur-Sang Anglais	271	0 à 18 mois	10%	Pagan (1998)
Suède	Cheval de selle Suédois	879	6 mois – 15 ans	13%	Jönsson *et al*., (2011)
France	Pur-Sang Anglais	130	6 mois	25%	Lepeule *et al*., (2009)
France	Trotteur Français	151	6 mois	34%	Lepeule *et al*., (2009)
France	Selle Français	97	6 mois	53%	Lepeule *et al*., (2009)
Norvège	Trotteur Norvégien	753	6 à 21 mois	14,3%	Grøndahl *et al*., (1991)
Italie	Maremmano	350	2 à 3 ans	16,6%	Pieramati *et al*., (2003)
Belgique	Chevaux de selle Belges	223	1 à 3 ans	30,9%	Vander Heyden *et al*., (2012)
Suède	Trotteur	674	17 mois	35,9%	Sangren *et al*., (1993)
Pays-Bas	KWPN	1231	*NA*	44,3%	Vos (2008)
Belgique	Chevaux de selle Belges	142	1 à 3 ans	44,4%	Vander Heyden et al., (2008)
Espagne	Pur Race Espagnol	309	1 à 12 ans	48,8%	Boado *et al*., (2016)
Norvège	Trotteur Norvégien	1162	Yearlings	50,7%	Lykkjen *et al*., (2011)
Pays-Bas	KWPN	811	Plus de 9 mois	69,5%	Van Grevenhof *et al*., (2009)
Brésil	Pur-Sang Anglais	84	4 à 6 mois	76,5%	Bastos *et al*., (2017)

L'ostéochondrose est une pathologie multifactorielle. Les **contraintes biomécaniques** joueraient un rôle dans le développement de l'ostéochondrose. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'ostéochondrose se développe principalement sur des sites de prédilection de certaines articulations (van Weeren, 2006). La **génétique** est également un facteur important. Cependant, l'hérédité varie entre les races et les articulations et il existe de fortes interactions entre l'environnement du poulain et sa génétique (van Weeren, 2006; Ytrehus *et al.*, 2007). De plus, la prévalence d'ostéochondrose est plus importante dans les grandes races à croissance rapide avec peu de tissu adipeux que dans les petites races ou celles à croissance lente (Tableau 18) (Grøndahl, 1991; Sandgren *et al.*, 1993; Pagan, 1998; Riley *et al.*, 1998; Björnsdóttir *et al.*, 2000; Pieramati *et al.*, 2003; Strand *et al.*, 2007; Vander Heyden *et al.*, 2008, 2012; Vos, 2008; van Grevenhof *et al.*, 2009; Lepeule *et al.*, 2009; Lykkjen *et al.*, 2011; Boado et Lopez-Sanroman, 2016; Bastos *et al.*, 2017). En plus de ce tableau, une seule étude rapporte des lésions d'ostéochondrose chez des poneys âgés de 6 à 15 mois (Voute *et al.*, 2012). Ces différences de prévalence de la pathologie entre les races peuvent être en partie expliquées par le fait que chez le trotteur, le cartilage de croissance est plus épais avec plus de vaisseaux que chez le poney Fjord au niveau de la lèvre latérale de la trochlée du talus (jarret) (Hendrickson *et al.*, 2015). Ainsi, chez les chevaux de selle, un plus grand nombre de vaisseaux doivent être incorporés dans l'os durant la période postnatale que pour le poney Fjord (Olstad *et al.*, 2015).

L'**alimentation, l'exercice et la croissance du poulain** mais également de la **jument gestante** seraient aussi à l'origine de la pathologie (Figure A.46) :

L'hébergement du poulain : L'effet de l'hébergement (box, pâture ou pâture/box) n'est pas toujours observé selon les études (Vander Heyden *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2016). Il semblerait cependant que les poulains ayant accès à de l'exercice régulier soient moins à risque de développer des lésions d'ostéochondrose que les poulains n'ayant pas accès à de l'exercice ou de manière non régulière (Lepeule *et al.*, 2009).

La nutrition et la croissance du poulain : Les déséquilibres minéraux participent aux facteurs étiologiques de la pathologie. Par exemple, le manque de cuivre du poulain en croissance est associé à une augmentation du développement de lésions ostéoarticulaires (Carbery, 1978; Bridges *et al.*, 1984; Knight *et al.*, 1985, 1990; Gabel *et al.*, 1988; Hildebran et Hunt, 1993; Hurtig *et al.*, 1993; Coskun *et al.*, 2016). En effet, le cuivre est un cofacteur d'une enzyme intervenant dans la formation du collagène. Aussi, un excès en phosphore dans la ration distribuée aux poulains entre 2 et 6 mois entrainerait une augmentation du développement de lésions d'ostéochondrose (Savage *et al.*, 1993a).

De plus, il a été montré épidémiologiquement que les poulains (Pur-sang Anglais, Trotteurs et Selle

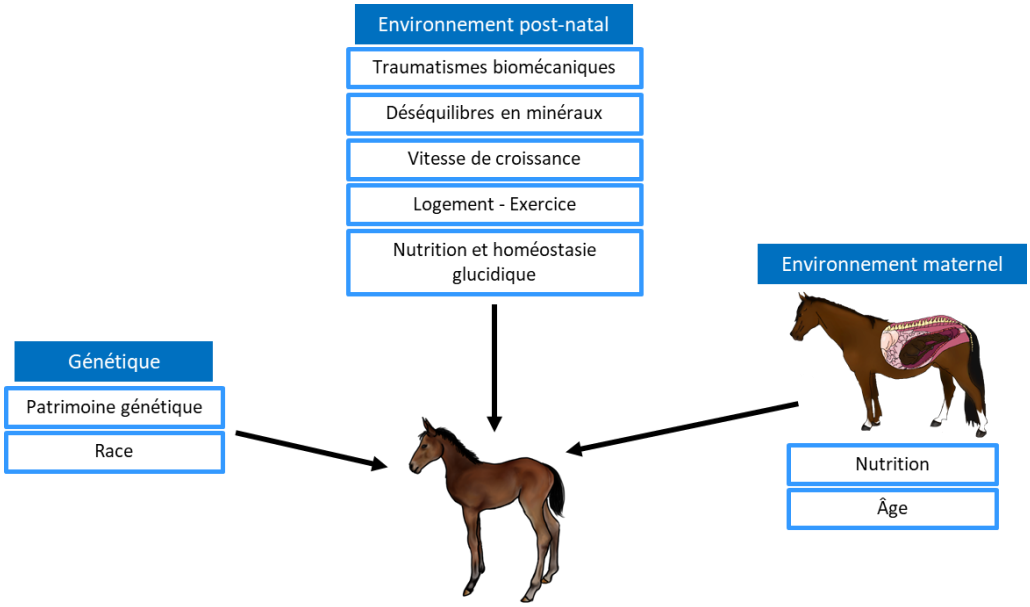


Figure A.46. Facteurs précoces influençant le développement des lésions d'ostéochondrose chez le poulain en croissance

Français) avec une hauteur au garrot élevée pour leur âge étaient plus à risque de développer des lésions d'ostéochondrose (Lepeule et al., 2009). Ces observations ont été validées expérimentalement. En effet, les poulains qui présentaient une vitesse de croissance accélérée entre 3 et 8 mois ou jusqu'à 12 mois étaient plus touchés par des lésions ostéoarticulaires que les poulains présentant une vitesse de croissance modérée (Pagan, 1998; Donabédian *et al.*, 2006). De plus, les poulains surnourris en énergie entre 2 et 6 mois étaient plus nombreux à présenter des lésions d'ostéochondrose, d'une gravité plus importante, que les poulains nourris à 100% de leurs besoins (Savage *et al.*, 1993a, b). Une étude mécanistique a validé ces observations en montrant que la surnutrition des poulains conduisait à des altérations du développement articulaire (Glade et Belling, 1986).

Enfin, il a été montré que les poulains nourris avec des concentrés entre 6 et 18 mois avaient plus de risque de développer des lésions d'ostéochondrose. De même, les poulains nourris uniquement avec des fourrages durant cette période, s'ils présentaient des lésions à 6 mois, avaient plus de chance d'être guéris à 18 mois que les poulains nourris avec des concentrés (Mendoza *et al.*, 2016). Ces résultats coïncident avec le fait que les poulains qui présentent une augmentation plus importante de la glycémie et de l'insulinémie post-prandiale ont plus de risque de développer des lésions d'ostéochondrose (Ralston, 1996; Pagan *et al.*, 2001). Ces altérations de la réponse post-prandiale seraient associées à des altérations de la concentration en hormones thyroïdiennes, ce qui conduirait à une maturation anormale des chondrocytes ou encore à un échec de la différenciation de ces cellules (Jeffcott et Henson, 1998).

L'environnement intra utérin : La présence de lésions d'ostéochondrose a été observée sur des poulains dès l'âge de 2 jours (Rejnö et Strömberg, 1978; Carlson *et al.*, 1995; Henson *et al.*, 1997b; Olstad *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que durant les 2 derniers tiers de la gestation, le cartilage epiphysaire du poulain subissait des changements importants de la structure du collagène et de la vascularisation et que le développement des chondrocytes fœtaux *in vitro* était sensible aux hormones telles que les IGF et l'insuline (Henson *et al.*, 1997a; Lecocq *et al.*, 2008). Ainsi, ces résultats montrent que le développement de lésions d'ostéochondrose peut commencer avant la naissance (Carlsten *et al.*, 1993b).

La supplémentation en cuivre des juments gestantes a des effets variés en fonction du mode d'administration. Ainsi il a été montré que la supplémentation de la ration des juments gestantes avec du cuivre en gestation diminuait l'incidence de lésions du cartilage articulaire chez les poulains à 3 ou 5 mois (Knight *et al.*, 1990; Pearce *et al.*, 1998a, b). Cependant, l'injection de cuivre à des juments gestantes ne semble pas avoir d'effet sur le développement de lésions ostéoarticulaires des poulains (Gee *et al.*, 2000, 2005, 2007).

En parallèle des observations réalisées chez les poulains en croissance, il a été montré épidémiologiquement et expérimentalement (voir *partie 3.3.1.2.3.*) que la distribution de concentrés aux juments en gestation augmente le développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains en croissance (Vander Heyden *et al.*, 2012; Peugnet *et al.*, 2015). Ces observations sont associées avec une augmentation de la réponse insulinémique post-prandiale maternelle durant la gestation, impliquant un potentiel effet du métabolisme maternel sur le développement ostéoarticulaire du poulain (Caure et Lebreton, 2004; Peugnet *et al.*, 2015).

De plus, le risque de développer des lésions d'ostéochondrose est augmenté chez les poulains issus des juments de moins de 10 ans et de plus de 15 ans (Lepeule *et al.*, 2009). De plus, les poulains nés tôt (de janvier à mars) ou tard (après mai) dans la saison ont plus de risque de développer des lésions d'ostéochondrose (Pagan, 1998; Lepeule *et al.*, 2009).

Enfin, une étude réalisée au sein d'un élevage de Trotteurs Français en Basse-Normandie a observé une corrélation négative entre les concentrations plasmatiques en Immunoglobulines G (IgG) 48h après la naissance et le développement de lésions d'ostéochondroses à l'âge de 6 mois (Caure and Lebreton, 2004). La qualité du colostrum peut être altérée par l'alimentation de la jument au cours de la gestation (Hammer et al., 2011). Ainsi, un mauvais transfert d'immunité à la naissance pourrait conduire au développement de cette pathologie par la suite.

4.2.3. Ostéochondrose et performances sportives

La libération d'un fragment osseux dans le cartilage peut conduire à une inflammation de la synovie (synovite) et un gonflement de l'articulation. L'ostéochondrose peut également conduire à une fracture sous-chondrale ou à des lignes d'usure et de la chondromalacie (Jeffcott et Henson, 1998). Cette pathologie peut donc conduire à des boiteries voire des immobilisations (Richardson, 2011). Les fragments peuvent être retirés par chirurgie mais ces opérations sont couteuses et reculent l'âge d'entrée en course des chevaux (Laws *et al.*, 1993). En Suède, l'ostéochondrose compte pour 5,7% des morts attribuées au système musculosquelettique chez des chevaux de selle (Wallin *et al.*, 2000).

Les résultats de performance sont controversés en fonction des races, des disciplines et des études. Chez le trotteur, il n'a pas été montré de corrélation entre la présence de lésions d'ostéochondrose, les performances, les gains et la longévité en course. (Jrgensen *et al.*, 1997; Langlois *et al.*, 2006). Cependant, les chevaux qui avaient plusieurs lésions avaient tendance à avoir de moins bonnes performances associées à une moins bonne longévité (Jrgensen *et al.*, 1997). Dans une étude différente, les trotteurs atteints d'ostéochondrose courent moins longtemps que les trotteurs sains (Laws *et al.*, 1993). De plus, les Trotteurs Français présentant des lésions d'ostéochondrose se qualifient moins que les chevaux sains (Robert *et al.*, 2006). La présence de fragment et de lésion

d'ostéochondrose diagnostiqués chez des yearlings Pur-sang Anglais, n'ont pas d'influence sur le nombre de courses courues, le pourcentage de courses où le cheval fini classé et le montant gagné au total et par course lorsqu'ils sont âgés entre 2 et 3 ans. Cependant, la présence d'un kyste sous-chondral tend à diminuer le montant gagné au total et par course par le cheval entre 2 et 3 ans (Kane *et al.*, 2003). Chez le cheval de selle Belge, l'ostéochondrose disséquante diminue les performances en saut d'obstacle (Verwilghen *et al.*, 2013).

Parmi ces études, une seule a pu prendre en compte l'influence de la chirurgie post examen radiographique (Laws *et al.*, 1993). Cependant, la valeur des chevaux opérés étant plus élevée que ces des chevaux non opérés, l'analyse statistique des performances n'a pu être réalisée. Les autres études n'ont pas pris en compte ce facteur qui a pourtant une influence possible sur les résultats de performances.

En résumé

L'obésité et l'ostéochondrose sont deux maladies à forte prévalence au sein de la filière. Elles affectent le bien-être des animaux, la performance sportive ainsi que l'économie de l'industrie équine.

Ces maladies sont multifactorielles mais ont également une origine intra utérine.

Les objectifs des recherches scientifiques actuelles sont donc :

- de mieux comprendre l'influence de l'environnement précoce sur le développement de ces maladies

- de trouver à terme des solutions peu coûteuses pour prévenir l'apparition de ces pathologies et donc d'améliorer le bien-être des chevaux et l'économie de la filière.

5. Objectifs de la thèse

Les filières équines Française, Européennes et Internationales sont aujourd'hui majoritairement tournées vers la production de chevaux athlètes. Il faut donc que ces chevaux soient sains, exempts de toute maladie et que leur physiologie soit adaptée pour la performance de haut niveau et les efforts intenses.

De nombreuses pathologies métaboliques telles que l'obésité, la résistance à l'insuline, la fourbure, ou dont la pathogénèse est liée au métabolisme comme l'ostéochondrose ont des prévalences élevées au sein de la filière et altèrent les performances et le bien-être des chevaux ainsi que l'économie de la filière. Le rôle de tous les acteurs (*e.g.* hormones, nutriments) impliqués dans les altérations métaboliques complexes conduisant à ces maladies n'a pas été encore élucidé.

D'après le concept des Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD), le phénotype à l'âge adulte peut être modulé dès la conception, suggérant qu'il serait possible de prévenir le développement de ces affections en agissant très précocement. Pour cela, l'influence des pratiques d'élevage, depuis le moment de la conception, sur le développement des poulains, néessite d'être exploré.

Ainsi l'**objectif de cette thèse** est d'explorer les **effets du métabolisme maternel durant la gestation chez le poulain,** *via* **trois modèles différents,** sur :

- **la structure et la fonction placentaire à terme,**
- **la maturation testiculaire à 1 an,**
- **la croissance, le métabolisme énergétique et la santé ostéoarticulaire jusqu'à 1 an et demi**

Trois modèles de modification de la nutrition maternelle et/ou fœtale ont été développés :

Modèle 1 "Effet de la supplémentation en concentrés dans la ration" : Pour étudier l'effet de la **nutrition pendant la seconde moitié de gestation**, des juments ont été nourries à partir du 7ème mois de gestation avec des fourrages uniquement ou ont été supplémentées avec des concentrés (orge aplati) jusqu'au poulinage.

Modèle 2 "Effet de la parité" : Pour modéliser l'effet d'une **sous-nutrition fœtale** conduisant à une diminution du poids et de la taille des poulains à la naissance, des juments primipares ont été comparées à des juments multipares.

Modèle 3 **"Effet de l'obésité"** : Pour étudier l'effet d'une **nutrition non adaptée à long terme**, des juments **obèses avant l'insémination et pendant la gestation** ont été comparées à des juments **non obèses**.

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

- La partie B présente les protocoles des différents modèles mis en place et la conduite des animaux.
- La partie C présente les résultats en quatre parties :
  1. Résultats relatifs au protocole de nutrition en deuxième moitié de gestation (**Modèle 1**) :
     1.1. Article publié dans *PLOS One* (DOI : 10.1371/journal.pone.0169295) présentant le développement post-sevrage des poulains surnourris entre 20 et 24 mois.
     1.2. Article soumis à *Placenta* présentant la structure et la fonction du placenta à terme.
     1.3. Résultats complémentaires présentant la qualité du colostrum à la naissance.
  2. Résultats relatifs à l'étude des effets de la parité maternelle (**Modèle 2**) :
     2.1. Article soumis dans *Theriogenology* présentant la structure placentaire à terme et le développement des poulains jusqu'à 18 mois.
  3. Résultats relatifs à l'étude des effets de l'obésité maternelle (**Modèle 3**) :
     3.1. Article soumis dans *PLOS One* présentant le métabolisme maternel en gestation et le développement des poulains jusqu'à 18 mois.
     3.2. Résultats complémentaires présentant la structure et la fonction du placenta à terme.
     3.3. Résultats complémentaires présentant la qualité du colostrum à la naissance et la composition en acides gras du lait, du plasma de jument et du plasma de poulain jusqu'à l'âge de 3 mois.
  4. Etude annexe aux travaux de thèse : Mise au point d'une méthode alternative pour l'évaluation de l'état corporel de la jument gestante

Partie B : Protocoles expérimentaux

1. Présentation du projet

Cette thèse s'inscrit au sein du projet FOETALIM initié en 2010 par Pascale Chavatte-Palmer. Financé par l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) et le Fonds Eperon, ce projet est construit et mis en œuvre par l'UMR 1198 « Biologie du Développement et Reproduction » de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Jouy en Josas (78).

Les parties expérimentales sur les animaux ont été réalisées à la station expérimentale de la Valade (IFCE) à Chamberet (19).

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

- Le Centre Européen du Cheval de Mont-le-Soie (Belgique) qui a assuré le suivi des lésions ostéoarticulaires,
- L'EA 2608 Œstrogène, Reproduction, Cancer (OeReCa) de l'Université de Caen Normandie (14) qui a assuré l'analyse structurale et fonctionnelle des testicules des poulains prépubères,
- L'UMR 1331 TOXALIM de l'INRA de Toulouse (31), qui a assuré le dosage des hormones thyroïdiennes,
- La jumenterie du Haras du Pin (IFCE) qui nous a aidé à tester le protocole de mesures de l'épaisseur de tissu adipeux sous cutané chez des juments non gestantes (étude annexe).

La collecte des données incluses dans cette thèse a commencé au printemps 2014 et s'est achevée à l'hiver 2016.

2. Présentation des modèles expérimentaux.

2.1. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante

2.1.1. Etablissement du modèle

L'objectif de ce modèle était d'analyser les effets d'une supplémentation de la ration maternelle avec de l'orge aplati sur la santé des poulains après le sevrage et surnourris entre 20 et 24 mois. De plus, afin de comprendre l'origine précoce des phénotypes observés, les effets de l'alimentation maternelle sur la structure et la fonction du placenta, agent programmateur du phénotype de la descendance, ont été étudiés.

Une étude épidémiologique, réalisée en Belgique (Wallonie), démontrant un lien entre la distribution de concentrés au cours de la gestation et le développement d'ostéochondrose chez les poulains par la

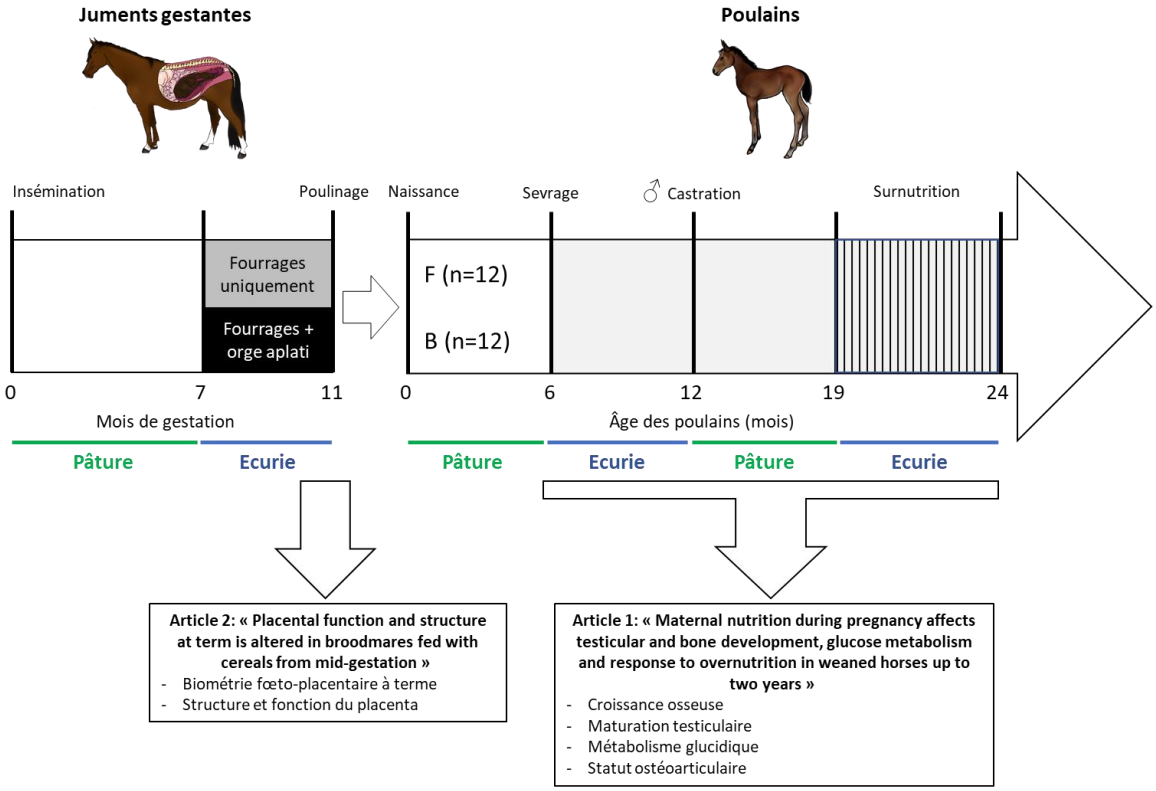


Figure B.1. Modèle 1 "Effet de la supplémentation en concentrés dans la ration"
Conduite des juments et poulains (fourrages ou supplémentation) et paramètres suivis

suite (Vander Heyden et al., 2012) a inspiré ce protocole expérimental. Une étude similaire avait déjà été réalisée aux Etats-Unis, mais sans l'étude de la structure et de la fonction placentaire et du statut ostéoarticulaire des poulains (Karren *et al.*, 2010; Thorson *et al.*, 2010; Cavinder *et al.*, 2012).

Le choix de la surnutrition des poulains entre 20 et 24 mois se base sur le concept du « second hit » et du « mismatch » (Gluckman et Hanson, 2004b). Nous cherchions à mettre en avant une susceptibilité accrue d'un des deux groupes d'animaux à développer des altérations métaboliques face à une surnutrition à base de céréales. Pour cela, nous avons placé les poulains dans un environnement démontré comme délétère chez le cheval et reflétant la préparation des animaux pour les ventes aux enchères.

Ce protocole expérimentala été établi au cours de la thèse de Pauline Peugnet qui s'est focalisée sur le suivi des juments gestantes et les poulains jusqu'au sevrage (Peugnet et al., 2015).

2.1.2. Conduite des juments et des poulains

La Figure B.1 présente la conduite des juments et des poulains du modèle 1.

Vingt-sept juments primipares (n=2) et multipares (n=25) ont été inséminées artificiellement avec la semence du même étalon entre mai et juin 2012. Depuis l'insémination jusqu'au 6ème mois de gestation, les juments ont été conduites en pâture comme un seul troupeau avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux (Krouner Rumi, CTH, France). A partir du 6ème mois de gestation, elles ont été rentrées en box et nourries avec une ration à base de fourrages uniquement jusqu'au 7ème mois de gestation. A ce moment-là, les juments ont été séparées en deux lots :

- Un lot "Fourrages" (F, n=14, 1 jument primipare) qui a reçu deux fois par jour une ration à base de fourrages uniquement (foin et foin enrubanné + compléments minéraux et vitaminiques (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France)) jusqu'au poulinage.
- Un lot "Concentrés" (B, n=13, 1 jument primipare) qui a reçu deux fois par jour une ration à base de fourrages (foin et foin enrubanné) et d'orge aplati (+ compléments minéraux et vitaminiques (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France)) jusqu'au poulinage.

Les juments ont été sorties deux fois par semaine dans une parcelle proche du bâtiment dépourvue d'herbe. Tous les poulains sont nés entre le printemps et l'été (avril-juin). Trois jours après le poulinage, les juments sont retournées au pré. Elles ont été conduites dans les mêmes pâtures avec leurs poulains avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux (Krouner Rumi, CTH, France) jusqu'au 6ème mois de lactation. Les poulains ont alors été sevrés par séparation abrupte et totale avec la mère et ont été logés en stabulations ouvertes, composées d'une aire paillée protégée et d'une aire non bétonnée en

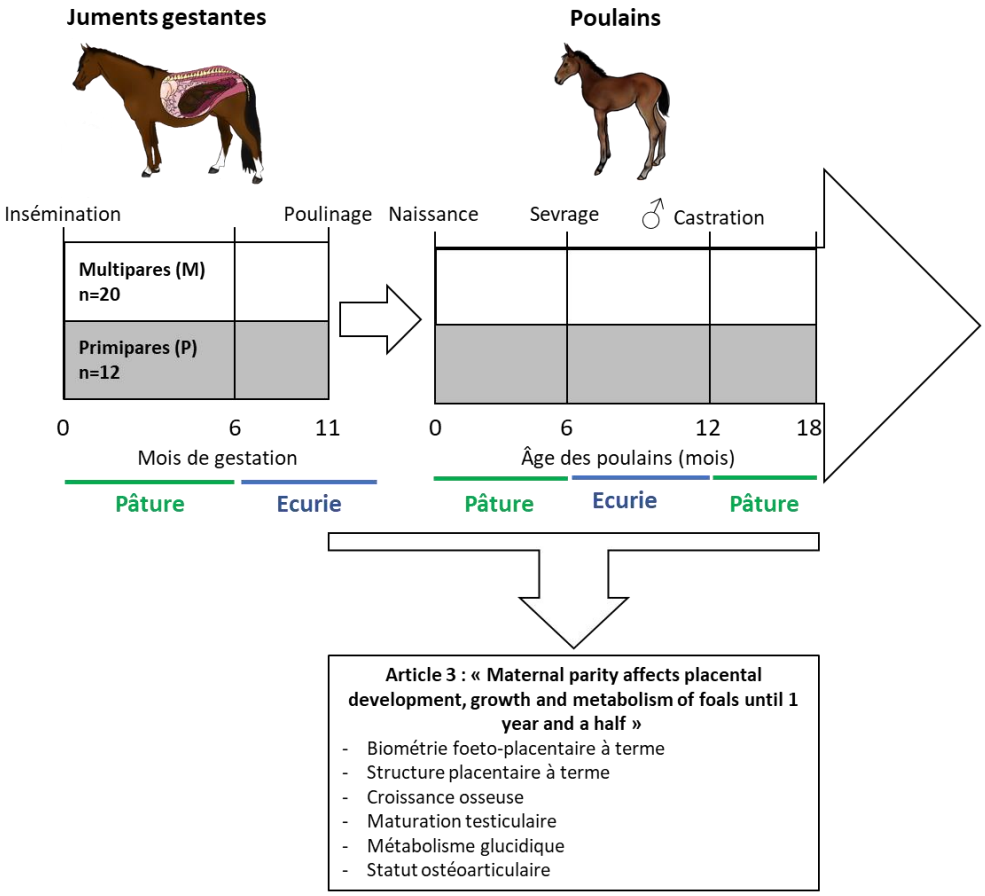


Figure B.2. Modèle 2 "Effet de la parité"
Conduite des juments et poulains et paramètres suivis

plein air. Les poulains ont été séparés en quatre groupes selon leur sexe et leur poids et ont été nourris en groupe deux fois par jour avec du foin et individuellement avec des bouchons préparés sur place composés d'orge, d'avoine, de tourteau de sojas, de son de blé, de mélasse et de vitamines et minéraux (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France) avec un distributeur de concentrés. A 12 mois, les poulains sont retournés en pâture, conduits comme un seul troupeau avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux (Krouner Rumi, CTH, France). A 19 mois, les poulains ont été de nouveau conduits en stabulation ouverte. Ils ont été séparés en trois groupes en fonction de leur poids pour réduire la compétition alimentaire. Ils ont été nourris deux fois par jour en groupe avec du foin et individuellement avec les mêmes bouchons que l'hiver précédent, par distributeur automatique. A partir de 20 mois, la quantité de concentrés a été augmentée (période d'adaptation de 18 jours) pour permettre un objectif de 500g de gain moyen quotidien entre 20 et 24 mois. Les poulains ont ainsi été nourris à hauteur de 140% des recommandations INRA et 135% des recommandations NRC pour des poulains de leur âge.

2.2. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle

2.2.1. Etablissement du modèle

Au sein de l'espèce équine, la littérature dédiée à l'effet de la parité maternelle sur la biométrie fœto-placentaire à terme, la structure placentaire et la croissance des poulains est aujourd'hui assez développée (*cf.* Introduction, Chapitre 3, paragraphes 3.3.1.4 et 3.4.2.4). Ces différentes études ont montré que les poulains issus de juments primipares naissent plus petits et plus légers, conservent ce retard durant la croissance jusqu'à au moins 2 ans et que les placentas des juments primipares ont un développement des structures d'échange haemotrophes moins important.

Malgré ces altérations importantes de la croissance fœtale et du transfert placentaire, aucune étude ne s'est penchée sur la nutrition histotrophe placentaire, la programmation métabolique et la fonction reproductive des poulains durant leur croissance.

L'objectif de cette étude est donc d'analyser les effets à long terme de la parité maternelle.

2.2.2. Conduite des juments et des poulains

La Figure B.2 présente la conduite des juments et des poulains du modèle 2.

Trente-deux juments primipares (n=12) et multipares (n=20) ont été inséminées artificiellement avec la semence du même étalon entre mai et juillet 2013. Depuis l'insémination jusqu'au 6ème mois de gestation, les juments ont été conduites en pâture comme un seul troupeau avec libre accès à de l'eau et des à sels minéraux (Krouner Rumi, CTH, France). A partir du 6ème mois de gestation, elles ont été

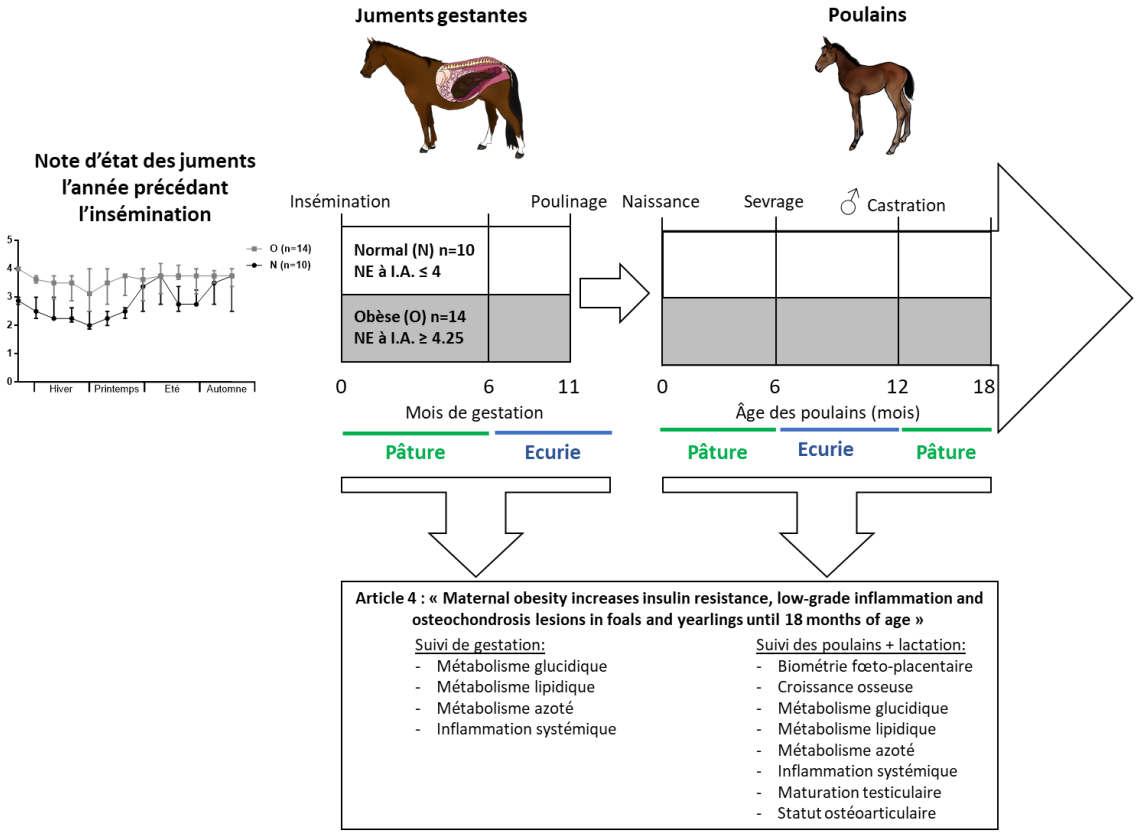


Figure B.3. Modèle 3 "Effet de l'obésité"
Conduite des juments et poulains et paramètres suivis
I.A.: Insémination artificielle.

rentrées en box et nourries avec une ration à base de fourrages et d'orge aplati (+ compléments minéraux et vitaminiques (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France)) jusqu'au poulinage. Les juments ont été sorties deux fois par semaine dans une parcelle proche du bâtiment dépourvue d'herbe. Tous les poulains sont nés entre le printemps et l'été (avril-juin). Trois jours après le poulinage, les juments sont retournées au pré. Elles ont été conduites dans les mêmes pâtures avec leurs poulains avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux (Krouner Rumi, CTH, France) jusqu'au 6ème mois de lactation. Les poulains ont alors été sevrés par séparation abrupte et totale avec la mère et ont été logés en stabulations ouvertes, composées d'une aire paillée protégée et d'une aire non bétonnée en plein air. Les poulains ont été séparés en quatre groupes en fonction de leur sexe et de leur poids et ont été nourris en groupe deux fois par jour avec du foin et des bouchons préparés sur place composés d'orge, d'avoine, de tourteau de sojas, de son de blé, de mélasse et de vitamines et minéraux à l'auge. A 12 mois, les poulains sont retournés en pâture, conduits comme un seul troupeau avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux jusqu'à 18 mois.

2.3. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle

2.3.1. Etablissement du modèle

Au sein de l'espèce équine, la prévalence de l'obésité est importante. Le cheval étant une espèce herbivore, son état corporel fluctue au cours de l'année en fonction de la disponibilité en nutriments des pâtures. L'obésité chez le cheval serait donc caractérisée par un état d'embonpoint élevé tout au long de l'année, quel que soit l'apport nutritionnel. Les quelques essais de modélisation de l'obésité maternelle chez le cheval ont été réalisés en sur-nourrissant la jument au cours de la gestation. Cependant, à l'insémination, les juments avaient toutes un état corporel optimal (note d'état de 3,5 sur une échelle de 1 à 5). Ainsi, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'effet de l'obésité maternelle à long terme (tout au long de l'année) sur la programmation développementale de la descendance.

L'objectif de cette étude est donc d'analyser les effets de l'obésité maternelle, depuis l'insémination.

2.3.2. Conduite des juments et des poulains

La Figure B.3 présente la conduite des juments et poulains du modèle 3.

Vingt-quatre juments multipares ont été inséminées artificiellement avec la semence du même étalon entre mai et juillet 2014. A l'insémination, elles ont été séparées en deux lots :

- Un lot Normal (N, n=10). Les juments avaient une note d'état ≤4 à l'insémination et une note d'état moyenne optimale (3) et fluctuante (de 2 à 3,8) l'année précédente lorsqu'elles étaient non gestantes.

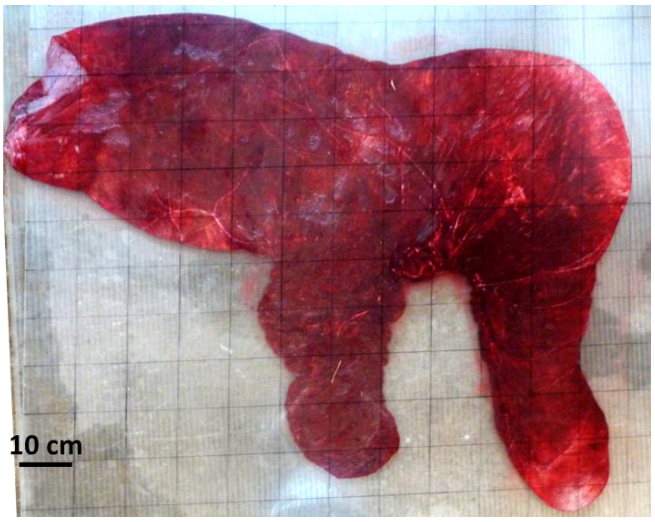


Figure B.4. Placenta en position « F » sous une plaque de plexiglas transparent pour mesure de la surface

- Un lot Obèse (O, n=14). Les juments avaient une note d'état ≥4,25 à l'insémination et une note d'état moyenne élevée (3,8) et stable (de 3,1 à 4) l'année précédente lorsqu'elles étaient non gestantes.

Depuis l'insémination jusqu'au 6ème mois de gestation, les juments ont été conduites en pâture en un seul troupeau avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux (Krouner Rumi, CTH, France). A partir du 6ème mois de gestation, elles ont été rentrées en box et nourries avec une ration à base de fourrages et d'orge aplati (+compléments minéraux et vitaminiques (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France)) jusqu'au poulinage. Les juments ont été sorties deux fois par semaine dans une parcelle proche du bâtiment dépourvue d'herbe. Tous les poulains sont nés entre le printemps et l'été (avril-juin). Trois jours après le poulinage, les juments sont retournées au pré. Elles ont été conduites dans les mêmes pâtures avec leurs poulains avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux (Krouner Rumi, CTH, France) jusqu'au 6ème mois de lactation. Les poulains ont alors été sevrés par séparation abrupte et totale avec la mère et ont été logés en stabulations ouvertes, composées d'une aire paillée protégée et d'une aire non bétonnée en plein air. Les poulains ont été séparés en quatre groupes en fonction de leur sexe et de leur poids et ont été nourris en groupe deux fois par jour avec du foin et des bouchons préparés sur place composés d'orge, d'avoine, de tourteau de sojas, de son de blé, de mélasse et de vitamines et minéraux à l'auge. A 12 mois, les poulains sont retournés en pâture, conduits comme un seul troupeau avec libre accès à de l'eau et à des sels minéraux jusqu'à 18 mois.

3. Structure et fonction du placenta à terme

3.1. Prélèvements et mesures à terme

Juste après la délivrance, des échantillons d'allantochorion ont été prélevés :

- Juste au-dessus de l'insertion du cordon ombilical (modèles 1, 2 et 3), au milieu de la corne gestante (modèles 1 et 2) et au milieu de la corne non gestante (modèles 1 et 2), 3 fragments d'environ 1cm² ont été fixés en paraformaldéhyde pour l'analyse structurale par stéréologie
- Juste au-dessus de l'insertion du cordon ombilical (modèles 1, 2 et 3), 3 fragments d'environ 3mm², ont été immédiatement congelés en azote liquide et conservés à -80°C pour l'analyse fonctionnelle

L'allantochorion seul a été pesé.

La surface plaentaire a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/) *via* l'analyse d'une photographie du placenta en position « F » (Figure B.4) sous une plaque de plexiglas transparente quadrillée (carreaux de 10x10cm). L'échelle a été définie selon la correspondance de

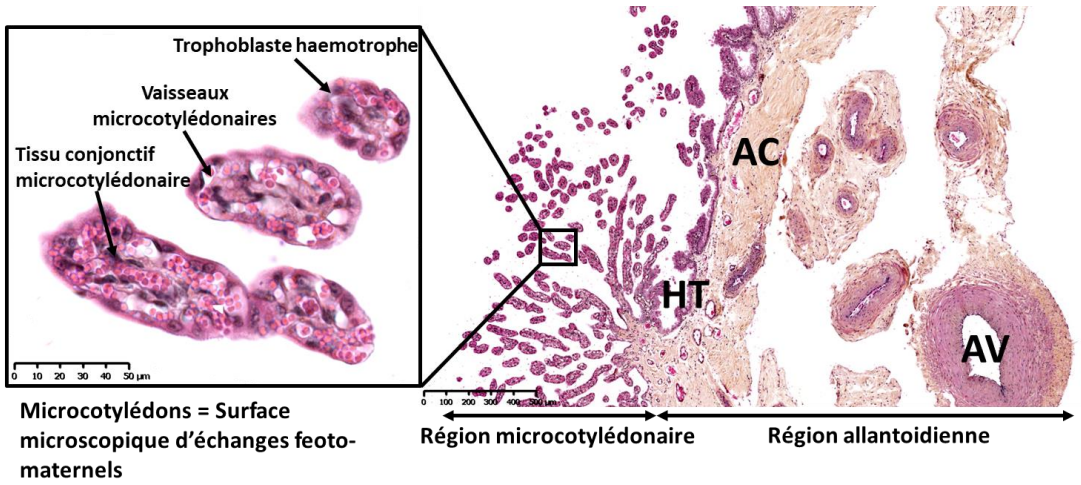


Figure B.5. Structure du placenta équin à terme et composants placentaires mesurés par stéréologie

AC: tissu conjonctif de l'allantoïde, AV: Vaisseaux allantoidiens, HT: trophoblaste histotrophe

10cm en pixels, le contour du placenta a été dessiné à la main pour obtenir la demi-surface du placenta. La surface a été obtenue en multipliant par 2 la demi-surface.

Le volume du placenta a été mesuré en immergeant le placenta dans un bac d'eau où le volume de l'eau avait été au préalable mesuré. Après immersion de l'organe, une fois tout l'air retiré, le volume total (eau + placenta) a été mesuré. La différence entre les deux volumes correspond alors au volume du placenta.

Cédric Dubois a effectué la plupart de ces mesures avec l'aide de stagiaires. J'ai participé à l'échantillonnage, la fixation des morceaux et aux mesures des placentas à la naissance sur une partie des juments du modèle 3.

3.2. Evaluation de la structure placentaire

Les fragments fixés en paraformaldéhyde ont été inclus en paraffine, des coupes d'une épaisseur de 7µm ont été réalisées et colorées à l'hématoxyline-éosine-safran. La surface et le volume des différents composants du placenta ont été mesurés à l'aide du module OneStop Stereology du logiciel Mercator (ExploraNova, France). Les composants mesurés étaient (Figure B.5) :

- Région microcotylédonaire : trophoblaste haemotrophe, tissu conjonctif, vaisseaux et microcotylédons en tant que somme des trois composants
- Région allantoidienne : trophoblaste histotrophe, tissu conjonctif (en considérant le conjonctif du chorion et de l'allantoïde comme un seul et même conjonctif du fait de l'impossibilité de les distinguer sur certaines coupes) et vaisseaux.

Pour les modèles 1 et 3, en plus des analyses stéréologiques, douze artérioles ont été aléatoirement sélectionnées au niveau de l'allantoïde. La surface de la lumière et la paroi des vaisseaux ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. L'échelle a été définie selon la correspondance de 500µm en pixels, puis les diamètres correspondant à la lumière et à l'intégralité de l'artériole ont été mesurée. La surface de la lumière a été calculée en moyennant les 2 diamètres correspondant puis en utilisant l'équation suivante :

$$Surface = \frac{d^2}{4} * \pi$$

L'épaisseur de la paroi a été mesurée en soustrayant les diamètres de la lumière des diamètres du vaisseau total et en divisant le tout par 2.

J'ai réalisé toutes les analyses des placentas du modèle 1. Emilie Nouveau a réalisé les analyses stéréologiques des placentas du modèle 3 lors de son stage de Master 2 et j'ai mesuré les épaisseurs des artérioles de l'allantoïde.

3.3. Evaluation de la fonction placentaire

Les ARN totaux des échantillons à destination des analyses fonctionnelles ont été extraits en utilisant la méthode Chomczynski. L'expression des gènes a été mesurée :

- Par RNAseq pour le modèle 1. Neuf placentas de chaque groupe ont été sélectionnés en fonction de l'âge de la jument et du sexe du poulain. Les séquençages ont été réalisés en triplicata et en paired-end sur un appareil HiSeq 3000 sequencing system (Illumina, USA) par Olivier Bouchez de la plateforme Get-PlaGe Genotoul de l'INRA de Toulouse. La qualité des données, le mapping et l'assemblage des reads, l'annotation des données et l'analyse statistique gène par gène ont été réalisées par François Piumi et Luc Jouneau (INRA de Jouy en Josas). J'ai par la suite réalisé l'analyse « Gene Set Analysis Enrichment » (GSEA) sur les données avec l'aide de Luc Jouneau. La méthode GSEA permet de prendre en compte la somme des modifications subtiles de l'expression de gènes impliqués dans une même voie métabolique (Subramanian *et al.*, 2005).

  Ainsi, à la différence de la méthode classique de comparaison gène par gène, plus adaptée aux modèles de perturbations d'expression génique importantes (*i.e.* KO), la méthode GSEA permet de mettre à jour des altérations d'expression de voies métaboliques en prenant en compte les milliers de transcrits qui y sont exprimés. J'ai réalisé les analyses GSEA sur les bases de données Kyoto Encyclopaedia of Genes ang Genomes (KEGG) et Gene ontology (GO).
- Par RT-qPCR pour le modèle 3 en utilisant des amorces dessinées et validées par Sarah Valentino lors de son stage de Master 2. Anne Couturier-Tarrade a traité les données brutes. L'expression des gènes impliqués dans la vascularisation (*FLT1, KDR* et *ENG*), dans le transport des nutriments (*SLC2A1, SLC2A3, SLC38A2, FAT/CD36* et *LPL*) et la croissance et le développement (*IGF2, H19* et *IGF-1R*) a été analysée. Ces mesures ont été réalisées par Emilie Nouveau lors de son stage de Master 2.

4. Mensurations et état corporel de la jument gestante et du poulain en croissance

4.1. Poids vif et notes d'état corporel des juments gestantes et allaitantes

Les juments gestantes et allaitantes ont été pesées tous les mois et leur état corporel a été évalué sur une échelle de 1 à 5 selon la grille présentée en introduction (Arnaud et al., 1997). L'ensemble de ces mesures a été réalisé par les techniciens expérimentés de la station expérimentale de Chamberet.

4.2. Mensurations et état corporel des poulains en croissance

Modèle 1 : A la naissance, à 6, 12, 19 et 24 mois, les poulains ont été pesés et leur hauteur au garrot (toise) et largeur du canon de l'antérieur gauche (pied à coulisse) ont été mesurés. La note d'état des poulains a été estimée à 19 et 24 mois par deux examinateurs entrainés (Arnaud et al., 1997).

Modèles 2 et 3 : De la naissance jusqu'à 6 mois tous les mois, puis tous les 3 mois jusqu'à 18 mois, le poids, la hauteur au garrot (toise) et le périmètre thoracique (mètre ruban) des poulains ont été mesurés.

Modèle 3 : La note d'état des poulains a été estimée à 11, 18, 19 et 20 mois (Arnaud et al., 1997)

4.3. Dosage des hormones impliquées dans la croissance

Les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes, triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4), ont été mesurées par méthode radioimmunologique (RIA) en utilisant un kit commercial humain (MP Biomedicals, Solon, USA) par Catherine Viguié à l'INRA de Toulouse (UMR Toxalim).

5. Métabolisme énergétique chez la jument gestante et le poulain en croissance

L'analyse du métabolisme énergétique des juments du modèle 1 a été réalisé par le Pauline Peugnet lors de son doctorat (Peugnet et al., 2015). Le métabolisme énergétique des juments du modèle 2 n'a pas été suivi lors de leur gestation.

Pour les juments du modèle 3, des prises de sang ont été réalisées tous les mois entre 8 et 9h (environ 16h après le dernier repas de concentré) sur des tubes recouverts d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) entre 6 et 10 mois de gestation. Les concentrations plasmatiques en différents facteurs sont alors dénommées « basales » car les animaux n'étaient pas à jeun. J'ai participé à ces prélèvements avec l'aide de Cédric Dubois, Joseph Bellonie et Cassandra Lavaud.

Accès libre à l'eau et à du foin durant toute la durée du test

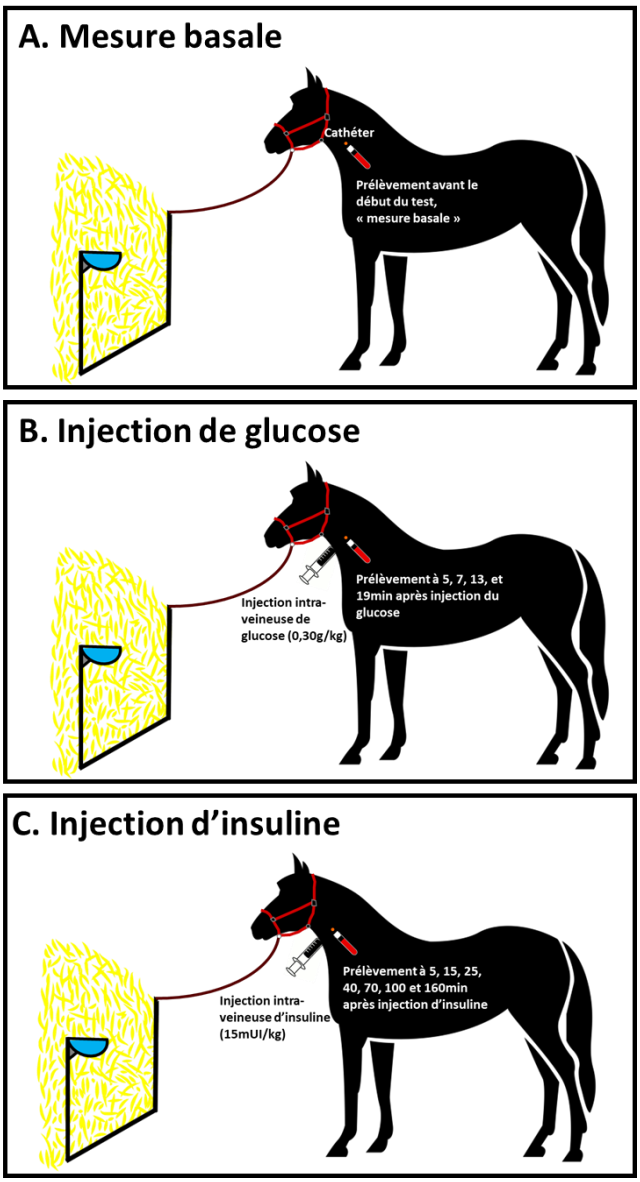


Figure B.6. Déroulement du frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIVGTT) modifié sur les animaux

Les chevaux ont accès à de l'eau et du foin durant toute la durée du test. Un cathéter est posé dans chaque veine jugulaire.

A. Au début du test, un échantillon de sang est prélevé à la jugulaire gauche.

B. Du glucose (0,30g/kg) est ensuite injecté dans la veine jugulaire droite et des échantillons de sang sont prélevés à la veine jugulaire gauche 5, 7, 13 et 19 min après le début de l'injection de glucose.

C. De l'insuline (15mU/kg) est ensuite injectée dans la veine jugulaire droite et des échantillons de sang sont prélevés à la veine jugulaire gauche 5, 15, 25, 40, 70, 100, 130 et 160 min après le début de l'injection d'insuline.

La durée totale du test est donc de 3h.

Pour les poulains des modèles 2 et 3, des prises de sang ont été réalisées sur tube EDTA à la naissance avant tétée, puis le matin, à 3, 30, 90 et 180 jours pour le modèle 2 et à 1, 3, 6 et 12 mois pour le modèle 3.

5.1. Evaluation du métabolisme glucidique

5.1.1. Prélèvements sur les animaux

5.1.1.1. Frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIVGTT) modifié

Le FSIVGTT modifié a été réalisé sur :

- Les juments du modèle 3 à 300 jours de gestation,
- Les poulains du modèle 1 à 19 et 24 mois,
- Les poulains du modèle 3 à 6, 12 et 18 mois.

Cette méthode permet l'estimation simultanée de la sensibilité à l'insuline (sensibilité des tissus périphériques et du foie confondus) et de la tolérance au glucose (Bergman *et al.*, 1981; Bergman, 1989, 2005). Le FISVGTT est qualifié de modifié car en plus de l'injection intraveineuse de glucose classique, une injection d'insuline est réalisée 20min après afin d'améliorer la capacité d'estimation de la sensibilité à l'insuline par le modèle mathématique. Elle ne requière pas de mise à jeun. Les animaux ont eu donc, dès la veille au soir et durant toute la durée du test accès libre à de l'eau et à du foin.

La Figure B.6 présente l'organisation du FSIVGTT sur les animaux. Un échantillon de sang a été prélevé sur tube EDTA avant le début du test (mesure basale) à l'aide d'un cathéter posé dans la veine jugulaire gauche. Les animaux ont été perfusés avec 0,30g/kg de glucose à l'aide d'un cathéter posé dans la veine jugulaire droite durant :

- 2min pour les juments gestantes, les poulains du modèle 1 à 19 mois et les poulains du modèle 3 à 12 mois,
- 4min pour les poulains du modèle 3 à 12 mois,
- 5min pour les juments gestantes, les poulains du modèle 1 à 24 mois et les poulains du modèle 3 à 18 mois.

Par la suite, des échantillons de sang ont été prélevés sur tube EDTA à 5, 7, 13 et 19min après le début de l'injection de glucose. A 20min, une solution diluée de 15mUI/kg d'insuline (Umuline rapide, Umuline Eli Lilly, USA) a été injectée dans la veine jugulaire droite pendant 1min. De nouveaux échantillons de sang ont alors été prélevés à 5, 15, 25, 40, 70, 100, 130 et 160min après l'injection d'insuline.

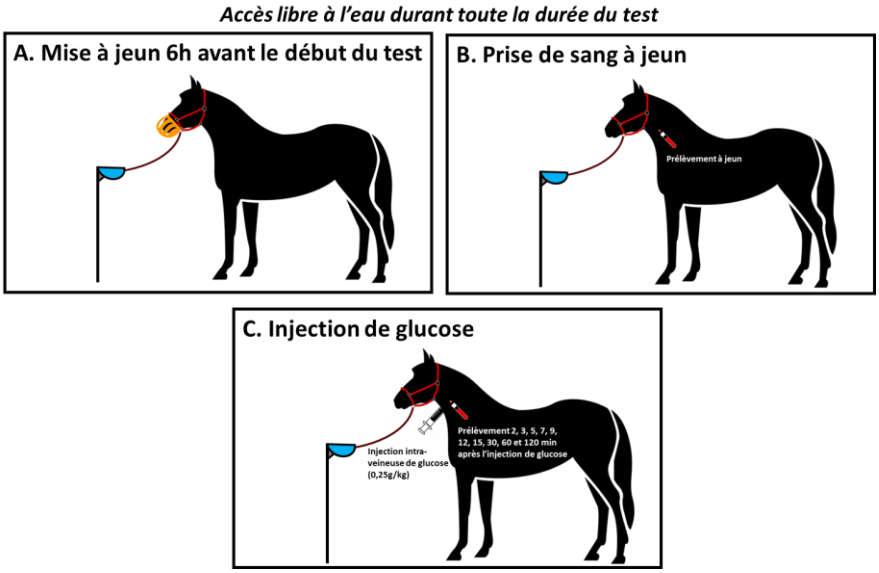


Figure B.7. Déroulement du test de tolérance intraveineux au glucose (IVGTT) sur les animaux
Les chevaux ont accès à de l'eau durant toute la durée du test. Un cathéter est posé dans chaque veine jugulaire.

A. Les chevaux sont mis à jeun à l'aide d'un panier 6h avant le début du test.
B. Un échantillon de sang est prélevé dans la veine jugulaire gauche à jeun.
C. Du glucose (0,25g/kg) est ensuite injecté dans la veine jugulaire droite et des échantillons de sang sont prélevés à la veine jugulaire gauche 2, 3, 5, 7, 9, 15, 30, 60 et 120min après le début de l'injection de glucose.

La durée totale du test est donc de 2h.

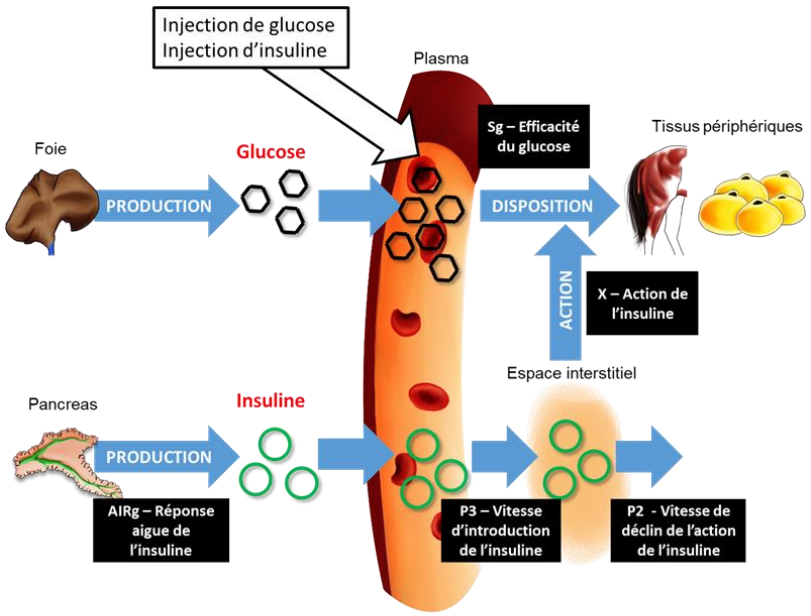


Figure B.8. Représentation schématique du modèle minimal de Bergman
Le glucose est produit et libéré par le foie à l'état basal. Après un repas ou une injection de glucose, la concentration en glucose plasmatique augmente. Le glucose va alors être disposé de deux manières dans les tissus périphériques:

- Par lui-même, au travers de transporteurs indépendants de l'insuline : L'**efficacité du glucose (Sg)** est la capacité du glucose de médier sa propre disposition.
- Par le biais de l'insuline : Les concentration élevées de glucose sanguin stimulent la production d'insuline par le pancréas. La **réponse aigüe de l'insuline (AIRg)** représente la production d'insuline par le pancréas dans les 10 min suivant l'injection de glucose. L'insuline est ensuite transférée dans l'espace interstitiel suivant une vitesse **P3**. Elle va alors être au contact de son tissu cible et agir selon une action **X**. La vitesse de décroissance de cette action est alors nommée **P2**. La sensibilité à l'insuline est calculée en divisant **P2/P3**.

Enfin, l'**indice de disposition (DI)** est calculé en multipliant SI et AIRg et correspond à la capacité de réponse systémique de l'individu à l'augmentation de la glycémie

En tout, le test dure donc 3h par animal. La glycémie a été mesurée immédiatement à chaque prélèvement en utilisant un lecteur de glycémie (Freestyle optium, Abbott, USA). Le plasma a été séparé dans les 30min suivant le prélèvement par centrifugation et les échantillons ont été conservés à -20°C.

J'ai réalisé ces tests avec Cédric Dubois, Joseph Bellonie et Cassandra Lavaud.

5.1.1.2. Test de tolérance intraveineux au glucose (IVGTT)

Les tests de tolérance intraveineux au glucose (IVGTT) ont été réalisés chez les poulains du modèle 2 à 4 et 12 mois. Les poulains ont été mis à jeun 6h avant le début du test.

La figure B.7 présente l'organisation de l'IVGTT sur les animaux. Une prise de sang à jeun a été réalisée grâce à un cathéter posé dans la veine jugulaire gauche. Une solution de 0,25g/kg de glucose a été infusée pendant 2min. Des échantillons de sang ont été prélevés 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30, 60 et 120min après le début de l'injection de glucose. La glycémie a été mesurée immédiatement à chaque prélèvement en utilisant un lecteur de glycémie (Freestyle optium, Abbott, USA). Le plasma a été séparé dans les 30min suivant le prélèvement par centrifugation et les échantillons ont été conservés à -20°C.

J'ai réalisé ces tests avec Cédric Dubois et Joseph Bellonie.

5.1.2. Dosages d'insuline

Les concentrations plasmatiques d'insuline ont été mesurées par immunoassay à l'aide de la technologie AlphaLisa en utilisant un kit commercial humain (PerkinElmer, USA). J'ai validé ces dosages avec l'aide de Sylvaine Camous et j'ai réalisé tous ces dosages avec l'aide de Michèle Dahirel.

5.1.3. Calculs et estimation des indices métaboliques

5.1.3.1. Estimation des indices du modèle de Bergman (FSIVGTT) (Figure B.8)

Les différents indices estimés par le modèle minimal de Bergman ont été calculés en utilisant le logiciel MinMod Millenium (Ver 6.02, MINMOD Inc., 2001) (Boston *et al.*, 2003) :

- L'**efficacité du glucose** (Sg) représente la capacité du glucose à induire sa propre disposition, c'est-à-dire l'entrée du glucose par les transporteurs indépendants de l'insuline dans les tissus cibles.

- La **réponse aigue de l'insuline** (AIRg) correspond à la capacité du pancréas à produire de l'insuline dans les 10min suivant l'injection du glucose. Cet indice reflète ainsi la capacité de réponse des cellules β-pancréatiques.
- L'insuline est transférée dans l'espace interstitiel depuis le système sanguin selon une vitesse **P3**. L'insuline agit alors sur les tissus périphériques pour induire la disposition du glucose (action **X)**. Cette action décroit avec le temps selon une vitesse **P2**. La **sensibilité à l'insuline** (SI) est alors calculée en divisant **P2** par **P3**. Pour le modèle de Bergman, la sensibilité à l'insuline ne correspond donc pas à l'action même de l'insuline mais à la division de la vitesse à laquelle elle se retrouve en contact avec le tissu cible par la vitesse à laquelle son action diminue. Ainsi, plus l'hormone peut atteindre les tissus rapidement, plus son action sera rapide. De plus, si son action diminue lentement dans le temps, elle sera plus efficace.
- L'**indice de disposition** (DI) est calculé en multipliant AIRg et SI. Il correspond ainsi à la capacité de réponse systémique de l'individu à l'augmentation de la glycémie.

J'ai réalisé l'ensemble de ces analyses.

5.1.3.2. Calcul des aires sous courbe pour l'IVGTT

Les concentrations plasmatiques en glucose et en insuline ont été normalisées par rapport aux valeurs à jeun. Par la suite, les aires sous courbe des réponses glycémiques et insulinémiques ont été calculées avec la méthode des trapèzes (calculé par l'équation (valeur t_n + valeur $t_{n+}1)/(t_{n+1}-t_n)$) sur toute la période de prélèvement. J'ai réalisé l'ensemble de ces analyses.

5.2. Evaluation du métabolisme lipidique

Les dosages suivants ont été réalisés sur les prises de sang « basales » :

- Dosage des concentrations plasmatiques chez les juments du modèle 3 en acides gras non estérifiés (AGNE) et triglycérides (TG) plasmatiques réalisés par Benedicte Lagofun par méthode colorimétrique en utilisant l'appareil Cobas Mira (Roche, Mannheim, Allemagne). J'ai réalisé les analyses statistiques.
- Dosage des concentrations plasmatiques chez les juments et les poulains du modèle 3 en leptine et adiponectine. Ces dosages ont été réalisés à l'aide de la technologie AlphaLisa en utilisant un kit commercial humain (PerkinElmer, USA). J'ai validé ces dosages et les ai réalisés avec l'aide de Michèle Dahirel.

5.3. Evaluation du métabolisme azoté

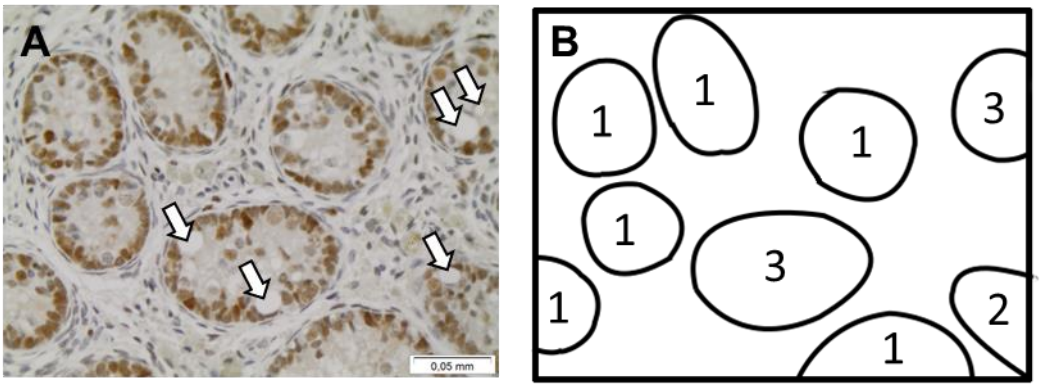


Figure B.9. Exemple de classification des « lumen score » dans un testicule de poulain prépubère

Le lumen score est une méthode qui permet d'estimer la maturation testiculaire d'un individu. Ce système de score est basé sur une échelle de 1 à 7. Ici dans le cadre de poulains prépubères, il n'a jamais été observé de score supérieur à 4.

A. Coupe histologique de testicule de poulain prépubère âgé d'environ 1an marquée par immunohistochimie de la protéine PCNA. Les flèches blanches situent les vacuoles dans le tissu.

B. Représentation des lumen scores au sein de chaque tubule selon l'échelle suivante:

LS1: Tubule totalement fermé (pas de vacuole).

LS2: Tubule contenant une vacuole.

LS3: Tubule contenant plusieurs vacuoles indépendantes dispersées aléatoirement.

LS4: Tubule contenant plusieurs vacuoles agrégées.

Les concentrations plasmatiques basales en urée des juments du modèle 3 ont été mesurées par Benedicte Lagofun par méthode colorimétrique en utilisant l'appareil Cobas Mira (Roche, Mannheim, Allemagne). J'ai réalisé les analyses statistiques.

5.4. Evaluation de l'inflammation systémique

Les concentrations plasmatiques en sérum amyloïde A (SAA) ont été mesurées, chez les juments et les poulains du modèle 3, en utilisant un kit commercial multi espèces (Phase™ range SAA kit, Tridelta Development Ltd, Ireland) au préalable validé chez le cheval par le fabricant. J'ai réalisé ces dosages avec l'aide de Michèle Dahirel.

6. Maturation testiculaire

6.1. Castration

Les poulains mâles des 3 modèles ont été castrés en routine par la clinique vétérinaire des Drs. Aufils et Heng (19230 Arnac-Pompadour) autour de l'âge de 12 mois. Les testicules ont été prélevés et des morceaux ont été :

- Fixés en paraformaldéhyde pour des analyses structurales par stéréologie (modèle 1)
- Congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C pour des analyses fonctionnelles par RT-qPCR (modèles 1, 2 et 3)

Les prélèvements de testicules ont été réalisées par Camille Gautier ou par les techniciens de la station expérimentale. J'ai assisté au prélèvement des testicules des poulains du modèle 2. Les analyses structurales et fonctionnelles ont été réalisées par Camille Gautier et Isabelle Guenon de l'Université de Caen Normandie. J'ai réalisé toutes les analyses statistiques.

6.2. Structure des testicules prépubères

Les échantillons fixés en paraformaldéhyde ont été inclus en paraffine, coupés à une épaisseur de 5µm et colorés par une coloration hématoxyline-éosine-safran. Les « lumen scores » ont été mesurés par stéréologie en utilisant le module Stereology Tollkit (ADCIS S. A, France) du logiciel ImageScope (Leica Biosystems) (Figure B.9).

6.3. Fonction des testicules prépubères

Les ARNm totaux ont été extraits en utilisant un kit commercial (Sigma-Adrich, France). La fonction des testicules a été analysée par RT-qPCR. L'expression des gènes impliqués dans la maturation testiculaire

(Cyp19, Cx43, AR et STAR), marqueurs de l'immaturité testiculaire (AMH) et impliqués dans la mise en place de la barrière hémato-testiculaire (Occludine, N cadherine et β caténine), a été mesurée.

7. Lactation

7.1. Qualité du colostrum

La qualité du colostrum a été analysée par spectrométrie proche infrarouge par l'équipe Performance des Animaux et des Troupeaux (PERAQ) de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (Inra de Theix, Anne Ferlay et Donato Andueza) : lactose, matière grasse, acides gras saturés, acides gras insaturés, acides gras monoinsaturés, acides gras polyinsaturés et acide alpha linolénique (C18 :3ω3). La concentration en immunoglobulines G (IgG) a été mesurée à l'aide d'un Colotest® (refractomètre) (Cash, 1995; Chavatte *et al.*, 1998).

J'ai réalisé les analyses statistiques.

7.2. Profils en acides gras des plasmas de jument et de poulain et du lait jusqu'à 3 mois de lactation

Les profils en acides gras du lait, du plasma des juments et des poulains ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse à la naissance (avant la première tétée), 10 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois d'âge/lactation par Delphine Rousseau-Ralliard et Tiffanie Josse pour son stage de dernière année de DUT

J'ai réalisé les analyses statistiques.

8. Statut ostéoarticulaire des poulains

8.1. Réalisation des clichés radiographiques

Les clichés radiographiques ont été réalisés :

- A 24 mois pour les poulains du modèle 1
- A 6, 12 et 18 mois pour les poulains du modèle 3

Pour la réalisation des clichés radiographiques, les poulains ont été tranquillisés avec une combinaison de détomédine (Domosedan®) et de butorphanol (Torbugesic®). Huit clichés radiographiques ont été réalisés pour chaque côté du poulain : une vue latéro-médiale de chaque boulet, une vue latéro-médiale et une vue oblique plantaro-latérale/dorso-médiale de chaque jarret et une vue latéro-

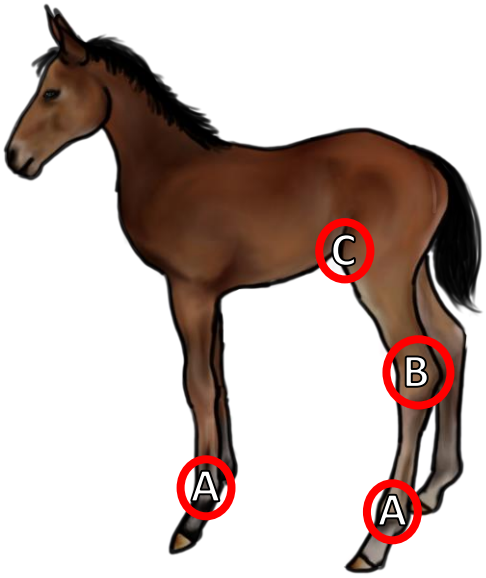


Figure B.10. Schéma récapitulatif des points anatomiques radiographiés
Huit clichés radiographiques ont été réalisés de chaque côté du poulain:
- Une vue latéro-médiale de chaque boulet (A),
- Une vue latéro-médiale et une vue oblique plantaro-latérale/dorso-médiale de chaque jarret (B),
- Une vue latéro-médiale de chaque grasset (C).

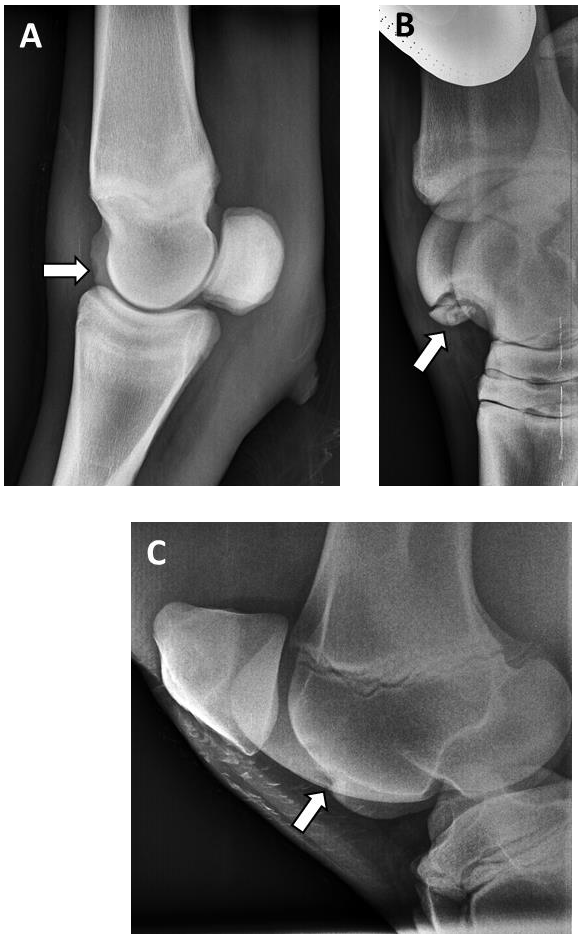


Figure B.11. Exemple de lésions d'ostéochondrose observées au niveau des articulations des poulains en croissance

A. Vue latéro-médiale d'un boulet postérieur droit montrant une lésion d'ostéochondrose au niveau du tenon médian du métatarsien principal.
B. Vue plantaro-latérale/dorso-médiale d'un jarret gauche montrant un fragment d'ostéochondrose en partie distale de la lèvre latérale du talus
C. Vue latéro-médiale d'un grasset gauche montrant une lésion d'ostéochondrose de la lèvre latérale de la trochlée fémorale

médiale de chaque grasset (Figure B.10). Les radiographies ont été réalisées par le Dr Mendoza avec l'aide de Mme Deliège du Centre Européen du Cheval de Mont-le-Soie pour les poulains du modèle 1. J'ai participé à la réalisation de tous les clichés radiographiques des poulains du modèle 3.

8.2. Lecture des clichés radiographiques et diagnostic

Chaque cliché a été interprété en aveugle selon la méthode précédemment développée par Denoix et collaborateurs (Denoix, 1990). Les clichés positifs présentaient des irrégularités du profil de la surface de l'os sous-chondrale, un fragment ostéochondral, ou un kyste osseux sous-chondral (Figure B.11). Les diagnostics ont été réalisés en double lecture par Luis Mendoza et Isabelle Caudron.

Partie C : Articles et résultats

Dans cette partie sont présentés les résultats obtenus au cours de la thèse sous forme d'articles publiés, soumis ou en préparation ainsi que sous forme de résultats complémentaires non encore insérés dans des publications.

Sommaire de la partie C :

1. **Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante**
   - 1.1. Article 1 : Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years
   - 1.2. Article 2 : Placental function and structure at term is altered in broodmares fed with cereals from mid-gestation
   - 1.3. Résultats complémentaires : Supplémentation en concentrés et qualité du colostrum à la naissance
2. **Modèle 2 : Effet de la parité maternelle**
   - 2.1. Article 3 : Maternal parity affects placental development, growth and metabolism of foals until 1 year and a half
3. **Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle**
   - 3.1. Article 4: Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age
   - 3.2. Résultats complémentaires : Effet de l'obésité maternelle sur la structure et la fonction placentaire à terme
   - 3.3. Résultats complémentaires : Effet de l'obésité maternelle sur la qualité du colostrum et du lait jusqu'au 3ème mois de lactation
4. **Etude annexe aux travaux de thèse : mise au point d'une méthode alternative permettant d'évaluer l'état corporel de la jument gestante**

1. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante

1.1. Article 1 : Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years

Morgane Robles, Camille Gautier, Luis Mendoza, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Jean-Philippe Lejeune, Isabelle Caudron, Isabelle Guenon, Sylvaine Camous, Anne Tarrade, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Hélène Bouraima-Lelong, Pascale Chavatte-Palmer.

PLOS One, 2017, 12;1:e0169295.
DOI: 10.1371/journal.pone.0169295.

Cette publication présente les effets d'une supplémentation en concentrés à partir du 7ème mois de gestation jusqu'au poulinage ou d'un régime uniquement composé de fourrages durant la gestation sur le développement post-sevrage des poulains, qui ont aussi été sur-nourris entre 20 et 24 mois (challenge alimentaire).

- La **croissance osseuse** a été suivie par mesures de la hauteur au garrot et de la largeur du canon de l'antérieur gauche jusqu'à 24 mois,
- La **maturation testiculaire** des poulains prépubères a été estimée par analyse stéréologique et RT-qPCR,
- Le **métabolisme glucidique** a été estimé en réalisant des modified Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test (FSIVGTT) à 19 mois (avant le challenge de surnutrition) et à 24 mois (après le challenge de surnutrition),
- Le **statut ostéoarticulaire** a été suivi par radiographie à 24 mois.

Les résultats montrent que la sous-nutrition maternelle entraine une diminution de la résistance à l'insuline, de l'épaisseur des canons et de la maturité testiculaire avant le challenge alimentaire. La surnutrition des poulains perturbe leur métabolisme glucidique et semble affecter plus fortement les poulains issus des juments ayant reçu des concentrés en deuxième moitié de gestation.

NB: Le développement pré-sevrage fait l'objet d'un article publié dans le cadre de la thèse de Pauline Peugnet et dont je suis co-auteur du fait de ma participation à ces travaux durant mon M2 et au début de ma thèse. Ce dernier article est présenté en annexe.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Maternal Nutrition during Pregnancy Affects Testicular and Bone Development, Glucose Metabolism and Response to Overnutrition in Weaned Horses Up to Two Years

Morgane Robles[1☯], Camille Gautier[2☯], Luis Mendoza[3], Pauline Peugnet[1], Cédric Dubois[4], Michèle Dahirel[1], Jean-Philippe Lejeune[3], Isabelle Caudron[3], Isabelle Guenon[2], Sylvaine Camous[1], Anne Tarrade[1], Laurence Wimel[4], Didier Serteyn[3], Hélène Bouraima-Lelong[2], Pascale Chavatte-Palmer[1]*

1 UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France, **2** Normandie Univ, UNICAEN, EA2608, OeReCa, USC-INRA, Caen, France, **3** Clinique Equine, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Liège, Belgium, **4** IFCE, Station Expérimentale de la Valade, Chamberet, France

☯ These authors contributed equally to this work.
* pascale.chavatte@jouy.inra.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Robles M, Gautier C, Mendoza L, Peugnet P, Dubois C, Dahirel M, et al. (2017) Maternal Nutrition during Pregnancy Affects Testicular and Bone Development, Glucose Metabolism and Response to Overnutrition in Weaned Horses Up to Two Years. PLoS ONE 12(1): e0169295. doi:10.1371/journal.pone.0169295

Editor: Clemens Fürnsinn, Medical University of Vienna, AUSTRIA

Received: September 9, 2016

Accepted: December 14, 2016

Published: January 12, 2017

Copyright: © 2017 Robles et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The Dryad URL of our data is: http://dx.doi.org/10.5061/dryad.76dn2. The DOI is: doi:10.5061/dryad.76dn2.

Funding: This work was funded by grants from the "Institut Français du Cheval et de l'Equitation" and by the "Fonds Eperon" (FOETALIM project). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, nor preparation of the manuscript.

Abstract

Introduction

Pregnant mares and post-weaning foals are often fed concentrates rich in soluble carbohydrates, together with forage. Recent studies suggest that the use of concentrates is linked to alterations of metabolism and the development of osteochondrosis in foals. The aim of this study was to determine if broodmare diet during gestation affects metabolism, osteoarticular status and growth of yearlings overfed from 20 to 24 months of age and/or sexual maturity in prepubertal colts.

Material and methods

Twenty-four saddlebred mares were fed forage only (n = 12, group F) or cracked barley and forage (n = 12, group B) from mid-gestation until foaling. Colts were gelded at 12 months of age. Between 20 and 24 months of age, all yearlings were overfed (+140% of requirements) using an automatic concentrate feeder. Offspring were monitored for growth between 6 and 24 months of age, glucose homeostasis was evaluated *via* modified frequently sampled intra veinous glucose tolerance test (FSIGT) at 19 and 24 months of age and osteoarticular status was investigated using radiographic examinations at 24 months of age. The structure and function of testicles from prepubertal colts were analyzed using stereology and RT-qPCR.

Results

Post-weaning weight growth was not different between groups. Testicular maturation was delayed in F colts compared to B colts at 12 months of age. From 19 months of age, the cannon bone was wider in B *vs* F yearlings. F yearlings were more insulin resistant at 19 months

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

compared to B yearlings but B yearlings were affected more severely by overnutrition with reduced insulin sensitivity. The osteoarticular status at 24 months of age was not different between groups.

Conclusion

In conclusion, nutritional management of the pregnant broodmare and the growing foal may affect sexual maturity of colts and the metabolism of foals until 24 months of age. These effects may be deleterious for reproductive and sportive performances in older horses.

Introduction

Since the early nineties, many epidemiological and experimental studies have shown that modifications of the nutritional environment during gestation and in childhood can affect offspring health at adulthood. The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) were first demonstrated in human populations [1], with low birthweight neonates or *in utero* underfed infants during the Dutch Hunger Winter having a higher risk of developing a metabolic syndrome as adults [2,3]. Effects of maternal nutritional imbalance on offspring health were subsequently confirmed using animal models [4].

Studies on DOHaD remain scarce in horses [5]. Embryo transfers between breeds of different size were performed to enhance or reduce fetal growth. Postnatal growth patterns were affected from birth until 3 years of age. Moreover, cardiovascular function, glucose homeostasis and endocrine function were altered until weaning [6–12]. Despite the fact that severe maternal undernutrition at mid-gestation related to an infection with *Streptococcus equi* was shown in one study to induce intra-uterine growth retardation (IUGR) [13], most other studies on effects of maternal nutrition indicate that moderate maternal nutritional excess or undernutrition in gestation does not affect birthweight [14–18]. Nevertheless, excess maternal nutrition during pregnancy, with or without carbohydrate supplementation, can affect glucose and lipid metabolism in foals until 160 days of age [13,15,17]. Moreover, an epidemiological study performed in Belgium in a large cohort of horses demonstrated that the incidence of osteochondrosis (OC) is higher in foals born to dams fed concentrates during gestation compared to foals whose dams received forage only [19].

Although there is limited evidence in humans and other species that maternal nutrition may affect offspring reproductive function [20], to our knowledge, consequences on sperm production and fertility remain unknown [21]. Of particular interest for the present study, maternal gestational undernutrition in rats and sheep affects pituitary responsiveness to Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) and testicular development and delays the onset of puberty [22–25]. Also, excess maternal nutrition in domestic animals has been shown to affect testicular development and to delay the onset of puberty [26–28]. To date, these effects have not been studied in horses.

In the equine industry, it is common practice to feed pregnant mares and post-weaning foals with concentrates in order to enhance the growth of fetuses and then foals that will be sold at 1 or 2 years of age [29,30]. The present study is a follow-up of previous work in which broodmares were supplemented (group B) or not (group F) with concentrates from mid-gestation to term [31]. Briefly, the daily supplementation of B mares with flattened barley (2 to 3 kg) provided additional net energy and digestible proteins from the 7^{th} until the 10^{th} month of gestation compared to F mares, allowing them to maintain optimal body condition throughout

pregnancy and lactation. Glycemic and insulinemic peaks were observed after each meal. F mares, fed forage only, were energy deficient and lost body condition until parturition. Lipomobilization was increased (as demonstrated by increased Non Esterified Fatty Acids plasma concentrations (NEFA)) as well as insulin sensitivity during late gestation in F mares, that were thus considered underfed compared to B mares that had maintained body condition. From birth until weaning, no difference was observed in foals' body measurements nor endocrine function (Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) and Non Esterified Fatty Acids (NEFA)). F foals, however, tended to have decreased glucose tolerance and lower osteocalcin concentrations at 3 days of age. At 6 months of age (weaning), these differences had disappeared and osteoarticular status did not differ between both groups of foals at that stage [31].

Here we compare growth, glucose metabolism, testicular maturation and joint health in these foals and yearlings from weaning to 24 months of age. In this period, a 5 month overnutrition challenge was performed from 20 to 24 months of age.

Materials and Methods

Animals

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

Experimental design, management and feeding of mares and foals. The experimental design is presented in Fig 1. Twenty-four (n = 2 primiparous and n = 22 multiparous) saddlebred mares (mean age 10 years; range 5–21 years) were fed forage only (F, n = 12) or cracked barley and forage (B, n = 12) from the 7th month of gestation until foaling. Management of

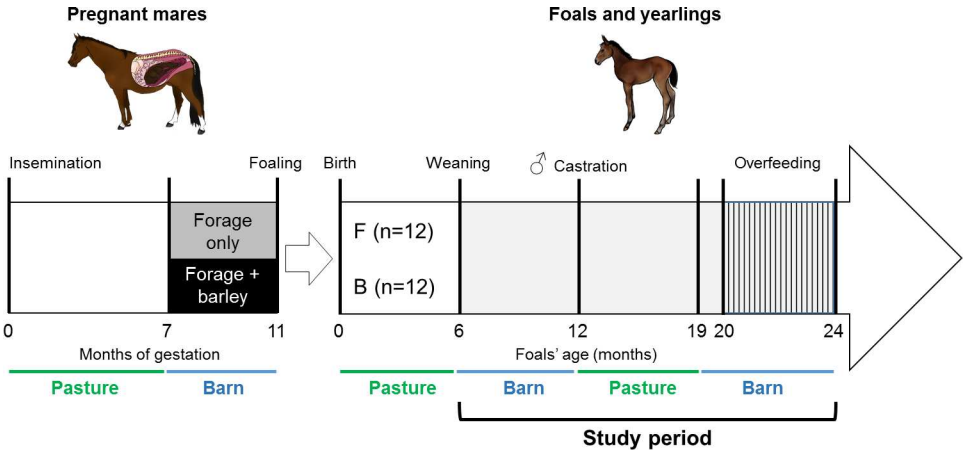


Fig 1. Experimental design from insemination of the broodmares until foals' 24 months of age. From insemination until 7 months of gestation, pregnant mares were managed as one same herd in the same pasture. From the 7th month of gestation, they were housed in individual boxes and allocated to one of two groups: fed with forage only (F, n = 12) or with forage and flattened barley (B, n = 12) until foaling. From 3 days until 6 months of age, foals were in pasture with their dams [31]. They were weaned at 6 months and housed in open barns and fed the same amount of feed, following the INRA recommendations for growing foals [29]. Colts were castrated at 12 months as a routine procedure. From 12 to 19 months of age, all yearlings were managed in the same pasture. At 19 months of age, all yearlings were housed in open barns and between 20 and 24 months of age, they were over nourished using an automatic feeder (+140% of INRA energy requirements, +135% of NRC energy requirements hatched part).

doi:10.1371/journal.pone.0169295.g001

Table 1. Daily nutritional supply given to yearlings during feeding challenge (19 to 24 months).

Median age (days)	Median age (months)	Type of Haylage	Hay (kg)	Haylage (kg)	Homemade pellets (kg)
576	19	H1	4	2.5	2
583	20	H1	4	2.5	4
594	20	H1	4	2.5	6
698	23	H2	4	2.5	6

H1 and H2 indicate when a different hay batch was used. N = 24.

doi:10.1371/journal.pone.0169295.t001

mares and foals from insemination to weaning has been described previously by Peugnet *et al.* [31].

In the present paper, colts born to primiparous dams (1 colt from a F dam and 1 colt from a B dam from the same protocol) have been added in the results analysis.

In their first winter, foals were housed in open barns and fed hay and concentrates in agreement with current INRA recommendations for growing foals [31]. Six months after weaning (April 25th, at 11 months of age), yearlings returned to pasture and were managed in one same herd with free access to water and minerals salts. On November 25th, at 19 months of age, all animals returned to open barns. Animals were separated in 3 groups sorted by bodyweight in 3 different stalls to reduce competition for food (housing group). They were group-fed hay and haylage twice a day and supplemented individually using an automatic concentrate feeder with homemade pellets containing barley, oat, soybean cake, bran, molasses and vitamins and minerals with free access to water. The automatic concentrate feeder allowed yearlings to ingest concentrates at least 4 times a day. The diet was adjusted to meet the requirements during 18 days of adaptation period [29].

From December 13th, at 20 months of age, all yearlings were fed to reach an average daily weight gain of 500 g for the upcoming 4 months. Thus, during this period, yearlings were fed 140% of INRA requirements [29] and 135% of the NRC requirements [32], with 62% of the energy of the diet provided by the pellets and 38% provided by forages. A different haylage batch was used at the end of the feeding challenge because the batch used as the start was out of stock. Table 1 presents the daily nutritional supply, Table 2 the quality of feedstuff (INRA feeding system) expressed as net energy (Horse Feed Unit–HFU–; 1 HFU = 2250 kcal), proteins (Horse Digestible Crude Proteins, HDCP), fibers (Raw Cellulose, RC), calcium and phosphorus and Table 3 the quality of feedstuff (NRC feeding system) expressed as digestible energy (estimated using the percentage of difference between net energy and digestible energy for the feedstuff, Mcal) and crude proteins (analyzed) during this period. Concentrate intake

Table 2. quality of feedstuff from INRA [29] given to yearlings during feeding challenge (19 to 24 months).

		Chemical composition (per kg of dry matter)			Mineral composition (per kg of dry matter)	
	Dry matter (%)	Net energy (Horse feed units, 1 HFU = 2250 kcal)	Horse digestible crude proteins (g)	Raw cellulose (g)	Calcium (g)	Phosphorus (g)
Homemade pellets	88.8	1.13	102	63.9	7.10	4.90
Hay	87.3	0.55	75	320.2	4.51	1.92
Haylage 1	78.8	0.72	90.58	239.1	9.44	2.29
Haylage 2	76.9	0.69	50.06	225.8	6.25	2.96

doi:10.1371/journal.pone.0169295.t002

Table 3. Quality of feedstuff from NRC [32] given to yearlings during feeding challenge (19 to 24 months).

	Chemical composition (per kg of dry matter)	
	Estimated digestible energy (Mcal)	Crude proteins (g)
Homemade pellets	3.55	126.3
Hay	1.60	60.1
Haylage 1	1.95	160.1
Haylage 2	1.86	111.1

doi:10.1371/journal.pone.0169295.t003

was monitored by the automatic concentrate feeder. As forage was distributed as bulk, however, individual forage intake and refusals were not monitored.

All animals were vaccinated and dewormed as for standard care.

Body measurements. At 6, 12, 19 and 24 months of age, foals and yearlings were weighed and withers' height and cannon width were measured. Body condition score (BCS, scale 1 to 5 [33]) was assessed by two independent trained operators at 19 and 24 months of age.

Evaluation of glucose metabolism

Fasting blood glucose. At 12 months of age, yearlings were fasted overnight with free access to water before blood sampling in the morning by jugular puncture into 10-ml EDTA coated tubes. Glucose blood concentration was immediately analyzed using a glucometer (Freestyle optium, Abbott, USA). Plasma was separated after 10 min centrifugation at 5500 rpm and stored at -20˚C.

Modified frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIGT). Modified FSIGT were performed at 19 (before nutritional challenge) and 24 months of age (at the end of the feeding challenge). The FSIGT is a method that enables the simultaneous evaluation of insulin sensitivity, glucose tolerance and insulin secretion by the pancreas [34]. Animals had free access to hay and water during the test. Both jugular veins were catheterized (Introcan, BBraun, Germany) 30 min before the beginning of the test. One catheter was used for infusion and the other one for sampling. Glucose (0.30 g/kg) was injected over 2 min (19 months of age) and 5 min (24 months of age) and 10 ml samples were collected on EDTA coated tubes at -5 min and 5, 7, 13, and 19 min after the injection started. At 20 min, a diluted solution of 30 mUI/kg insulin (Umuline Eli Lilly, USA) in isotonic sodium chloride (Aguettant, France) was injected over 1 min. Blood collection was performed 2, 6, 15, 25, 40, 70, 100, 130 and 160 min after insulin injection. Blood samples were processed as for fasting samples. FSIGT were not performed on two yearlings of each group due to behavioral issues.

Insulin assays. Plasma insulin concentrations were measured using a human insulin AlphaLISA immunoassay kit (PerkinElmer, USA).

Before the assay, inactivated and insulin-free fetal bovine serum (FBS) was prepared. FBS was heated at 55˚C for 1 hour and filtered on a 0.22-μm membrane. Insulin was removed using 50 mg/ml of active charcoal at 4˚C for 30 min. Three 20-min centrifugations at 4000 rpm were used to remove the charcoal and the FBS was filtered again on a 0.22 μm membrane and kept in aliquots at -20˚C. Standard samples of decreasing insulin concentrations were prepared in inactivated and insulin-free fetal bovine serum (FBS).

Plasma samples were thawed and maintained at 4˚C during the time of assay. Four microliter samples were distributed in duplicate in opaque 96 well plates (½ AreaPlate™, PerkinElmer, USA). A 4-μL mix of anti-insulin antibody (1 nM final concentration) and acceptor-beads (10 μg/ml final concentration) was then added. After 1 hour incubation at room temperature in the dark, 32 μL of streptavidin-coated donor beads (40 μg/ml final concentration)

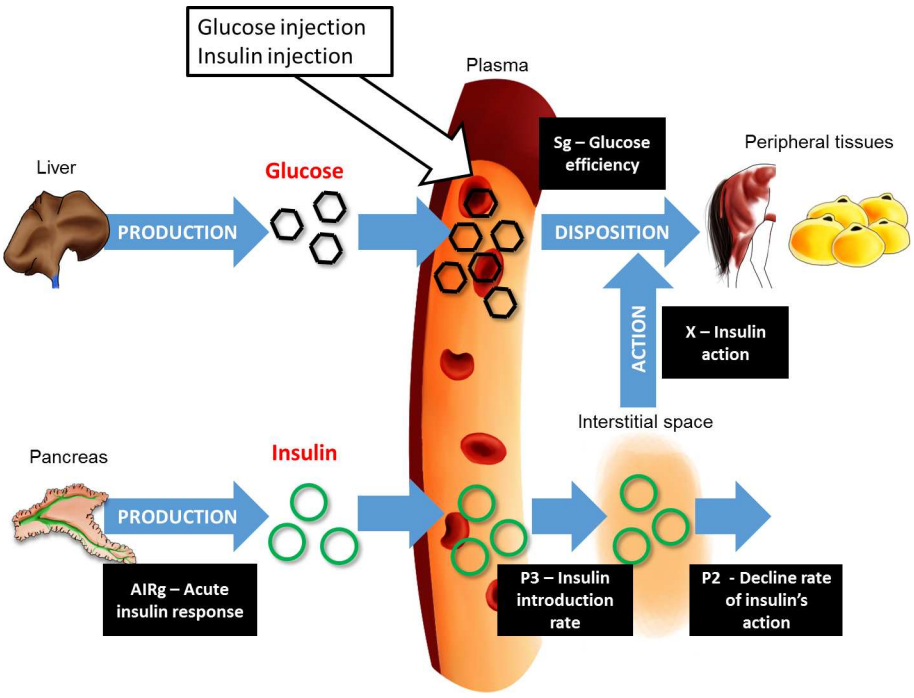


Fig 2. Schematic representation of the Bergman's minimal model (adapted from [34–36,38]). Glucose is produced and released by the liver in a basal state. After a meal, or a glucose intra-venous injection, the levels of plasma glucose increase. From the blood, the glucose will be disposed in the peripheral tissues by two ways:

- By itself. The glucose efficiency (**Sg**) is the capacity of the glucose to mediate its own disposal.
- Mediated by insulin. The elevated concentration of blood glucose induces the production of insulin by the pancreas. The acute insulin response (**AIRg**) represents the production of insulin by the pancreas during the first 10 minutes after glucose injection. Insulin is transferred into the interstitial space (**P3—insulin introduction rate**) from the bloodstream and reaches the peripheral tissues to mediate glucose disposal (**X -insulin action**). With time, insulin action declines at a rate calculated by the **P2** proxy. **Insulin sensitivity** (**IS**) is calculated as P2/P3.

Finally, the disposition index (**DI**) (multiplication of IS and AIRg) is used to describe β-cells responsiveness.

doi:10.1371/journal.pone.0169295.g002

were added. Plates were analyzed after 30 min incubation in the dark at room temperature, using the Enspire® reader and Manager software (PerkinElmer, USA).

The minimum level of detection was 5.3 mUI/L. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 6% and 7%, respectively. The assay was validated by dilutional parallelism between standard curve and endogenous insulin and expected values against obtained values.

Calculation of glucose homeostasis parameters from modified FSIGT assays. Glucose effectiveness (Sg), acute insulin response to glucose (AIRg), insulin sensitivity (IS) and the disposition index (DI) were calculated using the Bergman's minimal model [34–36] on the MinMod Millennium software (Ver 6.02, MINMOD Inc., 2001) [37]. Schematic representation of the different proxies calculated *via* the minimal model is presented in Fig 2.

Testicles

Tissue sampling and treatment. Testicles from prepubertal stallions (group F: n = 6 and group B: n = 7) aged 43–50 weeks were collected during routine castration. Castration were performed in order to have no significant difference in the age of the animals at the time of castration between groups. One sample was snap frozen on dry ice and stored at -80˚C for mRNA extraction while the other sample was fixed in 4% Paraformaldehyde (PFA)/ Phosphate

Buffered Saline (PBS) for at least 24 hours, dehydrated in a graded ethanol series, paraffin embedded and sectioned (5 μm) for stereological analysis and immunohistochemistry. Samples were randomly chosen.

Morphologic evaluation. To analyze testicular morphology, 5-μm sections were stained with 1% hematoxylin, 1% eosin and 0.2% green light solution using a classic protocol. Pictures were acquired with ScanScope® CS (Aperio, Leica). Testicular maturation was assessed with a stereological point-counting frame for whole slide image [39] on Stereology Toolkit (ADCIS S. A, Saint-Contest, France) using ImageScope (Leica Biosystems). A minimum of 202 points per grid was applied to each image with a 500-μm interval between points. The first point was placed randomly. Seminiferous tubules were classified according to maturation stage in prepubertal testis based on the lumen score (LS) system [40]. Three non-serial sections per animal (F group: n = 6 and B group: n = 7) were examined.

Immunohistochemistry. Sections were deparaffinized and rehydrated in graded ethanol series. Slides were then treated with 3% H_2O_2 in PBS for 10 min to inactivate endogenous peroxidase activity. Sections were boiled for 20 min in 0.1 M citrate buffer (pH 6.1) at 450 W in a microwave. Slides were blocked with PBS/triton 0.2%/dry milk 1% for 1 hour before overnight incubation with the primary antibodies directed against Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (FL-261, sc-7907, SantaCruz, USA) diluted 1:50 in PBS/0.5% dry milk in a moist chamber at 4˚C. After washing in PBS-Triton 0.2%, sections were incubated for 1h30 at room temperature with biotin-labeled goat anti-rabbit IgG and streptavidin-HRP conjugate secondary antibody (1:500) (A16096, ThermoScientific) and rinsed, followed by DAB (3,3′N-diaminobenzidine, R&D Systems) incubation. Sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt® medium (SigmaAldrich, USA). For negative control, the primary antibody was omitted. Analyses were performed with Olympus AX70 microscope and analyzed by AnalySIS getIT (Olympus). Six non-serial sections per animal (4 animals/group) were examined to estimate PCNA immunolabelling.

Quantitative real time PCR. Total mRNA was extracted with Tri-Reagent kit (Sigma-Aldrich, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (250 ng) was used for reverse transcription with 100 IU Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, France), 20 IU RNasin (Promega, France), 500 μM dNTPs (Promega, France) in a 20 μl final volume for 90 min at 37˚C. Real time PCR was performed with 5 μl of diluted cDNA (1:10), 0.5 μM of each primer (Eurogentec, France) and 10 μl of GoTaq qPCR Master-Mix2X (Promega, France) in a 20 μl final volume. PCR reactions were performed in a Stratagene Mx3005P apparatus (Agilent, France). Negative control contained water and all set primers were designed to be placed on different exons. The relative gene expression was normalized with GAPDH RNA expression.

The genes analyzed were markers of testicular maturity (Cyp19, Connexin 43 (Cx43), Androgen Receptor (AR), Steroidogenic Acute Regulatory Protein (STAR)), markers of immaturity (Anti-müllerian hormone (AMH)) and genes involved in the establishment of the blood-testis barrier (Occludin, N cadherin). Primer sequences are presented in Table 4.

Radiographic evaluation of osteoarticular status in yearlings

Yearlings were sedated using butorphanol (Dolorex®, 0.02 mg/kg IV, Intervet, France) combined with romifidine (Sedivet®, 0.06 mg/kg IV, Intervet, France) for radiographic examination at 24 months of age. Examinations were performed as previously reported [19] but development was made with a Vetray CR 2430 scanner (Sedecal, Spain). Radiographs were examined with an Examion CR Vita 45 (Carestream Health, USA) and analyzed blindly by two experienced examiners in a digital format with the Vita CR System Software V.3.2.

Table 4. Primers sequences used for amplification of equine products in RT-qPCR assays in testicles of prepubertal colts.

Gene	GenBank accession number	Primer	Size of PCR product (pb)
Anti-müllerian hormone (AMH)	JF330269,1	Forward: 5'—CCATCTGGAGGAGCCAAC—3'	80
		Reverse: 3'—CCCGTGACAGTGACCTCAG—5'	
Androgen Receptor (AR)	NM_001163891,1	Forward: 5'—AGTACTCCTGGATGGGGCTT—3'	132
		Reverse: 3'—TGTACATCCGGGACTTGTGC—5'	
B Catenin	NM_001122762,1	Forward: 5'-ACAATGGCTACTCAAGCCGA-3'	78
		Reverse: 3'—CCAGTGACTAACAGCCGCTT-5'	
Connexin 43 (Cx43)	XM_005596901,1	Forward: 5'—CTCTTCACCAACCGCTCCT—3'	68
		Reverse: 3'—CTGTCTCCGGTAACCAGCTT—5'	
Cyp 19	NM_001081805,1	Forward: 5'-AAAGCCACCCGGTTCCTAAC-3'	119
		Reverse: 3'-CCTTGATCTCAGGCGAAGCA-5'	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	AF157626	Forward: 5'-CCAGAACATCATCCCTGCTT—3'	158
		Reverse: 3'-CGTATTTGGCAGCTTTCTCC-5'	
N Cadherin	XM_001495782,3	Forward: 5'-GCCATTCAGACTGACCCGAA-3'	100
		Reverse: 3'—CTGCAGCGACAGTAAGGACA-5'	
Occludin	XM_001504044,3	Forward: 5'-AAGCTTCCATGTCAGTGCCTT-3'	84
		Reverse: 3'-TTGCTTGGTGCGTAATGATTGG—5'	
p450c17	D88184,1	Forward: 5'—CTGGGAGCAGGACAGAACAG-3'	126
		Reverse: 3'-CTGGGAGCAGGACAGAACAG-5'	
Steroidogenic Acute Regulatory Protein (STAR)	NM_001081800,1	Forward: 5'—TGGCCTATATCCAGCAGGGA-3'	142
		Reverse: 3'-AATACCTTGCCCACGTCTGG-5'	
Tight Junction Protein 1 (TJP1)	XM_005602842,1	Forward: 5'-CCATTGCCCTCCCAGTACAC—3'	148
		Reverse: 3'-GAGGTGGGTCTGGTTTGGAC-5'	
3beta-Hydroxysteroid dehydrogenase (3βHSD)	NM_001081911,1	Forward: 5'—CTTGCTGGTGGAGGAGAAGG-3'	106
		Reverse: 3'-CAGCTTGACCTTGCTCTGGA-5'	

doi:10.1371/journal.pone.0169295.t004

(Carestream Health, USA). OC was diagnosed according to the presence of lesions that were previously described [19,41,42]. Yearlings were classified as OC-positive according to the presence of one or more OC lesions identified by both examiners. One yearling of each group was not examined because of technical issues.

Statistical analysis

Results are expressed as median [quartile 1 –quartile 3] and presented as curves (median and interquartile range IQR) or boxplots (minimum to maximum). Statistical analyses were performed using the R software, version 3.0.2 [43]. Homoscedasticity and normality were tested before performing the statistical analyses.

There was no effect of sex of the foal nor of the interaction sex of the foal:diet of the dam for any measurements. These factors were thus removed from statistical models.

The longitudinal data of nutritional intake, growth and metabolism were analyzed using a type III ANOVA on a mixed linear model taking into account the dam's diet, time and interaction diet:time as fixed effects and the individual as random effect. For growth, a cubic B spline function was applied on the size at birth to include divergences of growth between yearlings. To analyze BCS and metabolism between 19 and 24 months of age, the housing group was added as fixed effect. When global differences were observed, t-test was used to compare groups at each time-point.

Testicular data were analyzed using a multiple factor analysis (MFA) [44] of the FactoMineR package [45]. The MFA is a factorial method that enables the study of several groups of

Table 5. Summary of the number of foals included in each analysis.

Analyses	Number of F foals	Number of B foals	Sex of foals	Reason
Feeding	12	12	M & F	
Body measurements	12	12	M & F	
FSIGT	10	10	M & F	Behavioral issues
Testicles analyses	6	7	M	
Radiography examination	11	11	M & F	Technical issues

doi:10.1371/journal.pone.0169295.t005

variables defined on the same set of individuals. Gene expression results were considered as one group of variables, stereological results as the other. Individuals and variables were graphically represented on the two first dimensions and a clustering analysis was applied on the data to confirm the results observed on the graphs. The age and weight of the foal at gelding did not affect any of the results and were therefore not included in the final analysis.

Radiographic results were analyzed using a chi-squared test.

Effects were considered significant when p-values<0.05.

In total, 24 foals (F, n = 12; B, n = 12) were obtained from weaning. All the foals and yearlings were measured from weaning until 24 months of age. FSIGT was performed on 20 foals and yearlings (F, n = 10; B, n = 10) due to behavioral issues. Analyses of testicles were performed on 13 colts (F, n = 6; B, n = 7). Radiography examinations were performed on 22 yearlings (F, n = 11; B, n = 11) due to technical issues (Table 5).

Results

Nutrition during feeding challenge from 19 to 24 months of age

Energy (p = 0.9), proteins (p = 0.9), fibers (p>0.9), calcium (p>0.9), phosphorus (p = 0.8) and concentrate intake (p = 0.7) did not differ between groups (Fig 3).

Growth and body condition

Growth. Diet of the dam did not affect foals' and yearlings' weight (p = 0.3) nor withers height (p = 0.2) at any time. The cannon bone, however, was narrower in F *versus* B yearlings at 19 (p = 0.02) and 24 months (p = 0.01) of age. During the feeding challenge, median daily weight gain was 476 g [364–517]. Average daily gain did not differ between groups at any time (p = 0.1) (Fig 4A, 4B and 4C). Yearlings of both groups had the same growth between 6 and 24 months.

Body condition. F yearlings were leaner than B yearlings by 0.5 point of BCS at 19 months of age (p = 0.02, Fig 4D). At 24 months this difference had disappeared (p = 0.7). BCS gain during the challenge was not different between groups (p = 0.1). F yearlings had slightly less fat than B yearlings before overnutrition but this difference disappeared after.

Glucose metabolism

Data from glucose metabolism analyses are presented in Table 6.

Fasting and basal plasma glucose and insulin. Fasting glucose and insulin plasma concentrations were not affected by the dam's diet at 12 months of age (p>0.9 and p = 0.3, respectively).

The nutritional challenge (from 19 to 24 months) enhanced basal insulin plasma concentrations in B but not F group (p<0.01 and p = 0.5, respectively). Basal glycemia did not differ at 19 months of age (p = 0.2) but was higher in F *versus* B yearlings at 24 months of age (p = 0.02).

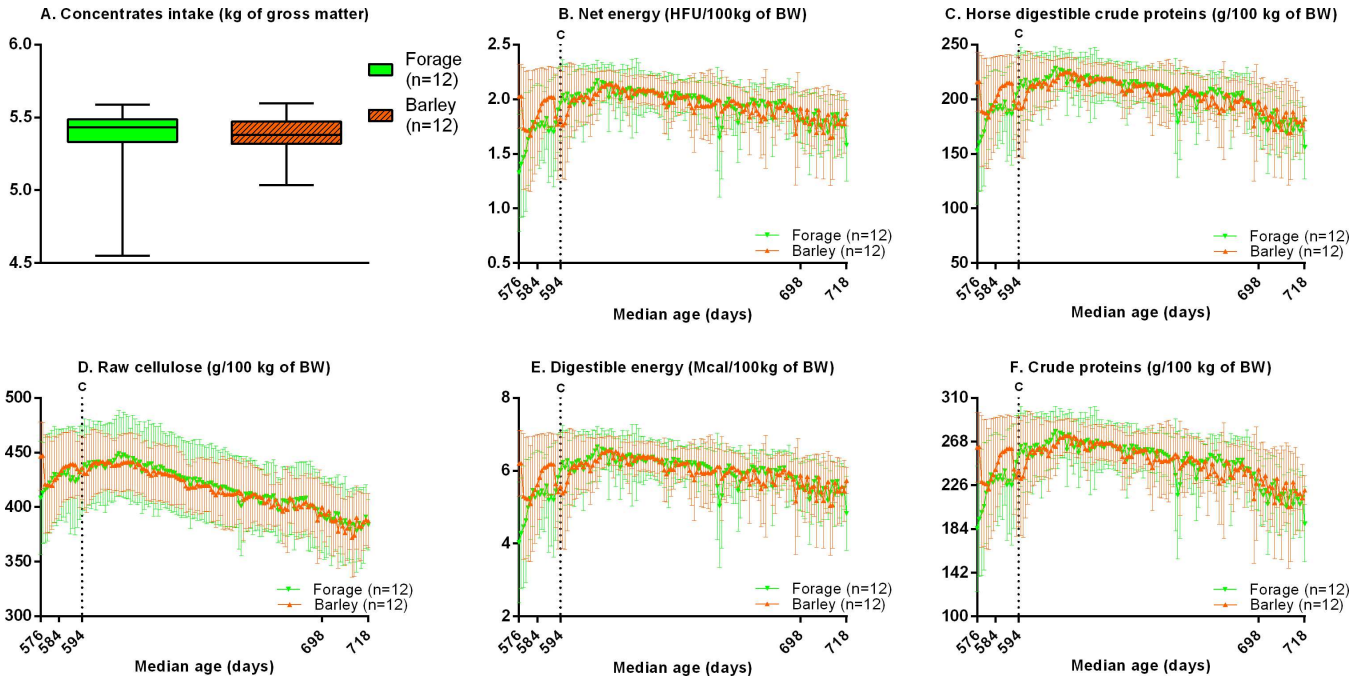


Fig 3. Daily feed intake (median and IQR) in terms of kg of brute matter of concentrates (A), net energy (B), estimated digestible energy (C), horse digestible crude proteins (D), crude proteins (E) and raw cellulose (F) during the feeding challenge of overnutrition. HFU: horse feed units, BW: Bodyweight, C: Beginning of the feeding challenge.

doi:10.1371/journal.pone.0169295.g003

Moreover, all yearlings had a lower basal glycemia at 24 compared to 19 months of age ($p<0.0001$). In addition, basal plasma glucose/insulin ratio (<0.0001) was lower in the B group at 24 months compared to 19 months of age. These results indicate alterations of metabolism of F foals towards insulin resistance at 24 months, as they were hyperglycemic compared to B foals.

FSIGT at 19 and 24 months of age. Effect of maternal nutrition. At 19 and 24 months, there was no difference for acute response of the pancreas, (AIRg, $p = 0.4$, $p = 0.5$, respectively), disposition index (DI, $p = 0.8$, $p = 0.4$, respectively) and Glucose effectiveness (Sg, $p = 0.1$, $p>0.9$, respectively) between groups. Sensitivity to insulin (IS), however, was lower in group F *versus* group B at 19 months but not at 24 months of age ($p = 0.048$ and $p = 0.9$, respectively). F yearlings were more insulin resistant than B yearlings at 19 months of age.

Effect of the feeding challenge. After the end of the feeding challenge, F and B yearlings had higher pancreas acute response to glucose injection (AIRg, $p = 0.02$, $p<0.01$) than before the feeding challenge. At 24 months of age, insulin sensitivity, IS, was reduced in group B ($p = 0.05$) without changes in group F ($p = 0.9$) compared to 19 months of age. At 24 months, glucose effectiveness (Sg) remained unchanged in both groups ($p = 0.5$ in F and $p = 0.5$ in B). These data indicate that overnutrition decreased IS and increased acute production of insulin by the pancreas in B yearlings. In F yearlings, the feeding challenge increased the pancreas acute response only. Overnutrition affected more the carbohydrate metabolism of B yearlings than F yearlings.

Testes

The proliferative activity of Sertoli cells was analyzed by PCNA immunohistochemistry. A strong immunostaining was visible in the basal region of the seminiferous epithelium

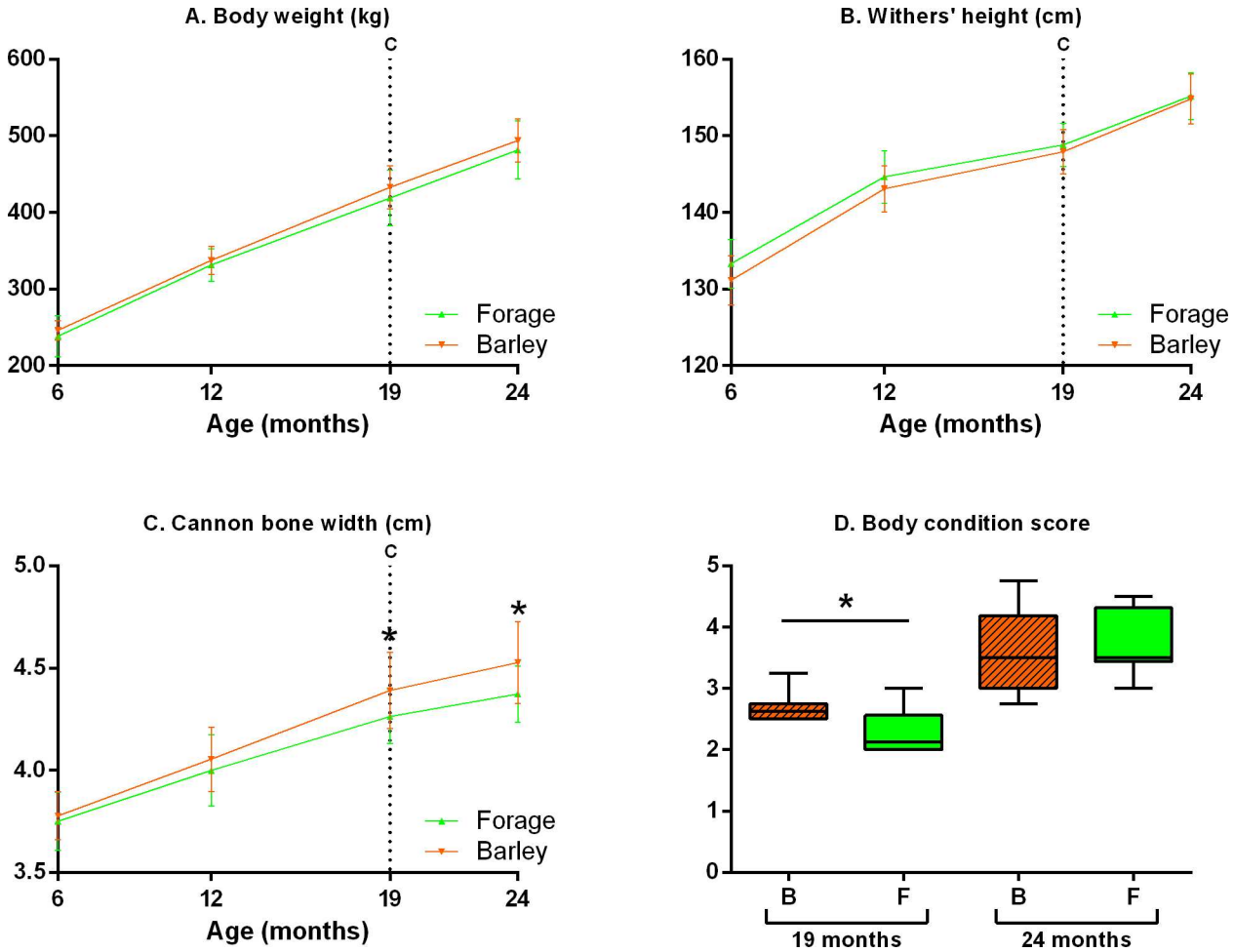


Fig 4. Foals' and yearlings' (median and IQR) body weight (A), withers' height (B) and cannon bone width (C) between 6 and 24 months of age and body condition score (D) at 19 and 24 months of age. B: Foals born to dams fed with barley and forage (n = 12), F: Foals born to dams fed with forage only (n = 12), C: Beginning of the feeding challenge. Values marked with an asterisk are significantly different (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0169295.g004

Table 6. Effects of the feeding challenge and age (median and IQR) on acute insulin response to glucose (AIRg), insulin sensitivity (IS), disposition index (DI) and glucose effectiveness (Sg), basal plasma glucose (GB) and basal plasma insulin (IB) in yearlings whose dams were fed with barley and forage (B, n = 10) or forage only (F, n = 10), at 19 and 24 months of age.

Age (month)	19		24	
Diet of dam	B	F	B	F
AIRg mU.min.L^{-1}	22.3^{a} [17.0–47.1]	46.0^{ab} [35.2–74.1]	74.1^{bc} [37.1–108.3]	109.9^{c} [81.7–142.6]
IS x10^{-4} L.mU^{-1}.min^{-1}	3.3^{a} [1.6–4.7]	1.8^{b} [1.4–2.2]	1.3^{b} [0.6–3.0]	1.7^{b} [1.1–2.3]
DI x10^{-2}	75.4^{a} [62.2–79.7]	95.3^{ab} [48.0–152.9]	115.2^{ab} [37.4–335.1]	158.2^{b} [96.5–238.6]
Sg x10^{-2}.min^{-1}	0.010 [0.008–0.016]	0.008 [0.006–0.009]	0.013 [0.010–0.015]	0.010 [0.007–0.012]
GB mg.dL^{-1}	114^{a} [108.5–124.9]	122.5^{a} [116–131.4]	79.5^{b} [73.9–85.6]	93.5^{c} [89.6–94.4]
IB mU.L^{-1}	4.3^{a} [3.5–5.4]	5.9^{ab} [3.7–6.7]	9.6^{b} [6.0–10.2]	8.2^{b} [6.0–10.6]

Different letters correspond to statistically different results (p<0.05), the use of the same letter corresponds to statistically non-different results (p>0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0169295.t006

associated both with Sertoli cells and gonocytes for both groups. Immunolabelling was also observed in peritubular cells (Fig 5).

The morphologic evaluation of testicular sections was realized according to the lumen score system reported by Heninger [40]. Due to the foals' age, only immature stages (LS 1 to 4) were observed: LS 1) tubules without a lumen; LS 2) tubules containing a single vacuole; LS 3) tubules containing several independent vacuoles and LS 4) tubules containing several aggregating vacuoles. LS 1 was the most represented in each group (group B: 43% and group F: 46%).

Functional and structural data obtained on the testicles by RT-qPCR and stereology were analyzed by MFA. On the variables factor map (Fig 6A), the first dimension (30.42% of the variability) separated the markers of testicular maturity. The expression of genes used as markers of immaturity (AMH) and involved in the establishment of the blood-testis barrier (Occludin, N cadherin) is located on the left side together with the first lumen score. The expression of

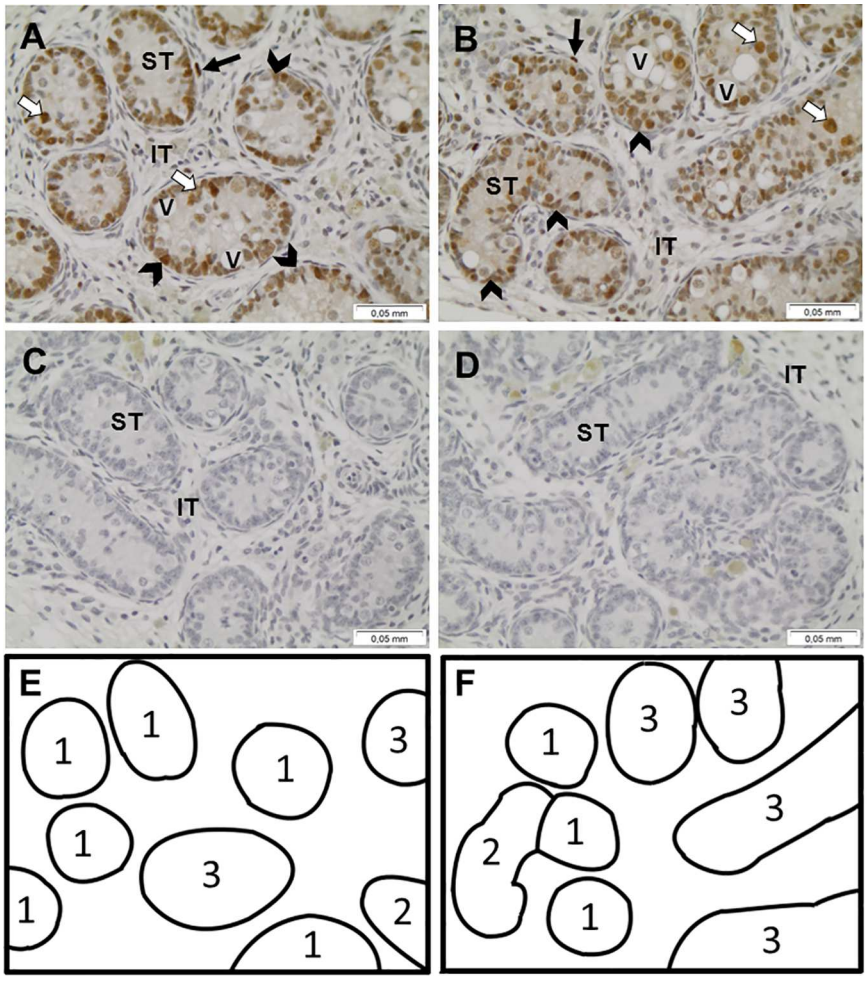


Fig 5. Immunohistochemical detection of PCNA protein in equine prepubertal testes. Representative testicular sections for foals born to forage fed (A, n = 6), or barley and forage fed dams (B, n = 7), with respective negative controls (C and D). Lumen scores are represented within each tubule for F foals in testicular section (E) and B foals in testicular section (F). Arrow heads indicate Sertoli cells, white arrows, gonocytes and black arrows, peritubular cells. ST: seminiferous tubule, IT: interstitial tissue, V: vacuoles. All cellular types constituting the seminiferous epithelium, Sertoli cells and gonocytes are positive for PCNA staining. Scale bar = 0.05 mm.

doi:10.1371/journal.pone.0169295.g005

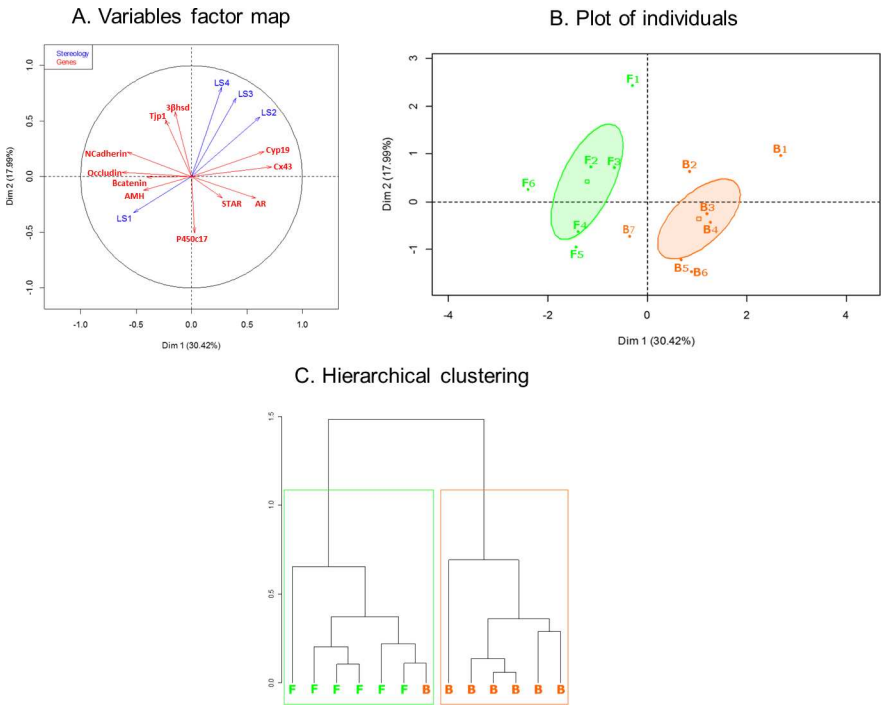


Fig 6. Variables factor map (A), plot of individuals (B) and hierarchical clustering (C) of the Multiple Factor Analysis (MFA) applied on gene expression (red arrows) and stereological (blue arrows) results. On the plot of individuals, foals born to dams that were fed with forage only (n = 6) are represented by the letter F and foals born to dams that were fed with barley and forage (n = 7) are represented by the letter B.

doi:10.1371/journal.pone.0169295.g006

genes indicating advanced testicular maturity (Cyp19, Cx 43, AR, STAR) is located on the right side together with the most advanced lumen scores. Group F clustered on the left of the plot whereas group B clustered on the right of the plot, with one B foal clustering with the F foals, very close to the middle of the plot, as shown Fig 6B. This was further confirmed by the hierarchical clustering analysis (Fig 6C).

In conclusion, testicles of F foals were less mature than those of B foals at 12 months of age.

Osteoarticular status

Seven animals were OC-positive at 24 months of age: 4 yearlings (2 fillies and 2 colts) in the F group (36.4%) *versus* 3 yearlings (2 colts and 1 filly) in the B group (27.3%). The proportion of yearlings with lesions did not differ neither between groups ($p>0.9$) nor between fillies and colts ($p>0.9$). Three of the F yearlings that had OC had only one lesion, localized either in the left hock, right stifle or left fetlock, whereas the last F yearling had lesions in both left and right hocks. In the group B, the 3 yearlings had only one lesion, either in the left fetlock, the left or the right hock. F and B yearlings were affected equally with OC lesions.

Discussion

In the present study, growth of foals from 6 to 24 months of age was not affected by maternal diet. Maternal undernutrition, however, seemed to affect bone growth as F foals had narrower cannons than B foals from 19 months of age but there was no difference for OC lesions between both groups of yearlings at 24 months of age. Moreover, testicles of F yearlings were less mature than those of the B group at 12 months of age, indicating that maternal undernutrition

affected prepubertal testicular maturation. The metabolism of foals was also disturbed by maternal undernutrition: at 19 months of age, F yearlings had decreased insulin sensitivity and increased basal glycaemia compared to B yearlings. From 19 to 24 months of age, all yearlings were overfed up to approximately 140% and 135% of INRA and NRC energy requirements, respectively [29,32] and ingested the same amount of concentrate throughout the feeding challenge. Although BCS gain was not affected, the feeding challenge enhanced acute pancreatic response and a decreased basal glycemia after overnutrition in both groups. Overfeeding affected B yearlings more strongly than F yearlings, as decreased insulin sensitivity and enhanced basal insulinemia were observed in B, but not F yearlings.

To our knowledge, there is no other reported study in horses evaluating the effect of overfeeding young horses born to dams fed different amounts and quality of energy sources during gestation. Studies in other species (sheep, goats and rabbits) indicate that maternal undernutrition increases offspring spontaneous feed intake, especially, but not only, when IUGR is observed [46–48], possibly due to effects on late gestational of early neonatal plasma leptin concentrations as leptin is necessary for the maturation of hypothalamic pathways leading to food intake regulation [48–51]. In the present study, we did not observe any difference in foal birthweight [31]. Consistent with our results, maternal undernutrition in late gestation in rabbits and sheep, with or without birthweight reduction, did not affect food intake in offspring whether or not they were submitted to an overnutrition challenge [52,53]. Nevertheless, in a study where goats were underfed in late pregnancy, effects on food intake were observed only in adult offspring [48,54]. Therefore, the yearlings studied here may have been yet too young to express these effects [54].

Before the feeding challenge, at 19 months of age, F yearlings were less insulin sensitive than B yearlings. Already at 3 days of age, F foals tended to be less glucose tolerant than B foals, which suggests that this insulin resistance persisted during growth [31]. In humans, epidemiological data from the Dutch Hunger Winter show that children exposed to maternal undernutrition in late gestation tend to have increased risks of developing type 2 diabetes at adulthood [55]. In sheep, offspring born to dams underfed in late gestation were shown to be glucose intolerant at 1 year of age, although, in that study, birth weight and post-natal growth did not differ from controls [56]. In the horse, pancreatic maturation takes place near term (290–327 days of gestation) [57]. In the present study, maternal undernutrition occurred from 200 to 321 days of gestation [31] when the foal's pancreas was maturing. The relative insulin resistance of F foals and yearlings might be an effect of a default in pancreatic maturation induced by maternal undernutrition during fetal development. As all foals were fed with concentrates during their first winter (6–11 months), it could be speculated that the difference between pre- and post-natal nutrition may have affected F foals more than B foals as indicated by the Predictive Adaptive Response hypothesis [58].

After the feeding challenge, these differences disappeared but basal glycemia was higher in the F group than in the B group. Consistent with these results, saddlebred foals that suffered IUGR through embryo transfer in ponies had higher fasting glycemia until 1.5 year of age [10,11].

The overfeeding challenge reduced insulin sensitivity in the B group only. The pancreas responded to overfeeding by secreting more insulin (increased AIRg), leading to higher basal insulin and lower basal glucose plasma concentrations. Consistently, in the adult horse, a diet rich in starch decreases insulin sensitivity, inducing an enhanced AIRg with or without an increase in basal insulin concentrations [38,59,60]. In contrast, the overfeeding challenge did not affect insulin sensitivity in F yearlings. Nevertheless, the pancreatic response to glucose, AIRg, using FSIGT test was higher at 24 months than at 19 months of age. Thus the increased pancreatic insulin secretion in response to the carbohydrate-enriched diet seemed to overcome

the lower insulin sensitivity and led to a decreased basal glycemia in both groups of animals at the end of the challenge. We hypothesize that F yearlings were less affected than B yearlings because they were already insulin resistant before the beginning of the feeding challenge. as shown in sheep, where overnutrition affected more the carbohydrate metabolism of lambs born to overnourished compared to undernourished dams in late gestation [61].

In sheep, late maternal undernutrition did not affect fat deposition in offspring, although a decreased subcutaneous:mesenteric fat ratio was observed [53]. In contrast, others showed that sheep underfed during gestation have a higher fat mass than controls [56,62]. In most studies, however, fat composition is measured through *post-mortem* weighing of central and peripheral adipose tissues or through alternative methods (such as deuterium oxide infusion, impedancemetry or densitometry) whereas in the present study only the overall peripheral adipose quantity was semi-quantitatively assessed through BCS. Interactions between glucose metabolism and fat deposition can therefore not be inferred from this study.

From weaning to the beginning of the feeding challenge, growth was not affected by maternal diet. B yearlings, however, had larger cannon bones than F yearlings at 19 and 24 months of age. In horses, the cannon bone width is linked to housing and exercise: foals housed in pastures or trained extensively have larger cannon bones than foals housed in stalls or with no exercise [63,64]. Increases in cannon bone circumference have also been associated to increased bone strength and mineral contents [63,64]. Here, both groups were housed in the exact same environment starting from birth but their exercise was not monitored. It has been shown in the rabbit and the rat that maternal undernutrition during pregnancy led to sedentary behavior in offspring [47,65]. Therefore, it could be possible that F foals were less active than foals from B group. This modification of the locomotor behavior could explain the difference of cannon width between both groups of foals.

As OC status is stable from 18 months of age [66], the feeding challenge applied to the yearlings in the present study did not affect the OC results. The correlation between cannon bone width and OC lesions has been rarely tested in the literature and the results are inconsistent [67,68]. Unlike what was shown epidemiologically [19], the maternal diet in the present study did not affect the development of OC lesions neither at 6 months of age—where there was only a tendency for an increase in OC lesions in B foals [31]—nor at 24 months of age. It has been shown, however, that feeding yearlings 4 times/day decreases both the postprandial glycemic peak and the area under the curve of the glycemia throughout the day compared to yearlings receiving 2 meals/day [69], suggesting that postprandial insulin concentrations may also have been decreased in the present study as yearlings were fed at least 4 times/day between 6 and 12 months of age. Since OC in foals has been linked to postprandial insulin plasma concentrations [70], we hypothesize that the use of an automatic concentrate feeder from 6 to 12 months of age in the present study may have reduced postprandial insulin levels compared to animals fed twice daily in a more traditional way and thus reduced the incidence of OC [71].

Puberty in stallions begins around 12 months and ends around 2 years of age [72,73]. Testes were collected at a pre-pubertal stage (10 to 12 months of age). At this stage, the seminiferous epithelium is composed of proliferative Sertoli cells, gonocytes and/or spermatogonia. In equine testes, the markers of puberty initiation were determined from observations that the acquisition of mature phenotype for Sertoli cells is associated with loss of AMH [74] and with an increase in junctional proteins (cx 43) [40,75]. In contrast, steroidogenic activity and sensibility to androgen increase with testicular maturation [75,76]. The effects observed here on testicular development, could be due to a direct action occurring during fetal life. Indeed, the change in maternal diet occurred at the beginning of testicular inguinal migration in fetuses (about 270 days of gestation) [77], when testicular differentiation is still regulated. Indeed, in rats and sheep, maternal undernutrition reduced seminiferous tubule diameter and Sertoli cell

numbers per tubule [24,25,78]. Another hypothesis would have been an effect of hormones: T3, leptin, insulin and IGF-1 plasma concentrations are known to increase with improved nutritional status in the fetus and neonate [31,79]. These hormones are directly active on testes [80,81]. Insulin and IGF-1 regulate Sertoli cell proliferation and FSH action in mice [80] and T3 affects Sertoli cell differentiation and blood-testis barrier assembly [81]. At 6 months of age, however, no differences were found in insulin levels and glucose metabolism, T3, and IGF-1 levels in both groups of foals [31], but there is no information available on earlier stages.

Conclusions

In conclusion, we showed that broodmare management in gestation may affect testicular maturation of colts at 12 months of age, glucose homeostasis of post-weaning yearlings, body condition score and cannon bone width from 19 months of age. Excess nutrition in the second winter after birth also affected the metabolism of B and F yearlings in a different manner, with no difference in growth pattern. Nevertheless, the study was performed on a limited number of animals of the same breed (Anglo-Arabian) and further confirmation on a larger number of animals and/or in another breed remains mandatory.

Supporting Information

S1 Fig. Validations of insulin assay. A. Dilutional parallelism between standard curve and endogenous insulin. To linearize the 4PL curve, logit was calculated as logit = log ((AlphaLISA signal (count)–minimum asymptote) / (maximum asymptote–AlphaLISA signal (count))). B. Expected insulin values against obtained values. Linear regression statistic test was applied to compare the equality of slope to 1 and intercepts to 0. Run-test was performed to determine whether data deviated significantly from the linear model. For both tests and for all samples, $p<0.5$. C. Bland-Altman graph comparing the expected insulin values against the obtained values.
(TIF)

S2 Fig. Effects of feeding challenge and age (median and IQR) on glucose and insulin during the modified frequent sampling intra venous glucose tolerance test in yearlings whose dams were fed with barley and forage (B, n = 10) or forage only (F, n = 10), at 19 and 24 months of age.
(TIF)

S3 Fig. Comparison of growth rate between the weight of foals and yearlings measured during the experimentation and the expected weight calculated using the 1–3 equation of NRC 2007 [32]. B: Foals born to dams fed with barley and forage (n = 12), F: Foals born to dams fed with forage only (n = 12). Values marked with an asterisk are significantly different ($p<0.05$).
(TIF)

S1 Table. Composition of the vitamin and minerals complement given to foals and yearlings in pasture.
(DOCX)

S2 Table. Composition of concentrate supplement given to foals and yearlings in open barns.
(DOCX)

S3 Table. Detailed calculations to obtain the DE (NRC 2007 [32]) values for feed (A) and comparison between calculated DE and NRC recommendations for growing foals (B). A.

Estimated DE has been calculated using the equation DE (Mcal) = (HFU*2.25)/ % value; "% value" being the % of difference between HFU and DE for a same feed of the same dry matter content. B. Comparison of calculated DE values with NRC recommendations for growing foals between 20 and 24 months calculated using the equation DE (Mcal/d) = $((56.5*X*10^{-0.145})*BW)+((1.99+1.21*X-0.021*X^2)*ADG)$. Where X = age in months, ADG = average daily gain in kg and BW = body weight in kg.
(DOCX)

S4 Table. Comparison of growth rate between the weight of foals and yearlings measured during the experimentation and the expected weight calculated using the 1–3 equation of NRC 2007 [32] and the estimated mature weight of the animals by averaging the weight of the sire and the weight of the dam at insemination. A. Calculation of expected weight and difference between calculated weight and real weight for each foal and yearling between 6 and 24 months. B. For animals of each group (B and F) at 6, 12, 19 and 24 months, median of real weight and calculated weight and results of statistical analyses (Type III Anova, mixed linear model, fixed effect: Group, random effect: Individual). C. For animals of each group (B and F), at 6, 12, 19 and 24 months, median of difference between calculated weight and real weight and results of statistical analysis.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) experimental farm (Domaine de la Valade, Chamberet, France) for care and management of animals and assistance during castrations, metabolic tests and radiographic examinations and to the CMABIO3 platform (Unicaen), especially Nicolas Elie (PhD) for his help. The authors 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)".

Author Contributions

Conceptualization: PCP LW DS.

Data curation: MR.

Formal analysis: MR CG LM JPL IC.

Funding acquisition: PCP.

Investigation: MR CG LM PP CD MD JPL IC IG SC LW.

Methodology: MR PCP DS HBL.

Project administration: PCP LW.

Resources: MR CG MD.

Supervision: LW DS HBL PCP.

Validation: MR.

Visualization: MR.

Writing – original draft: MR CG PCP AT HBL.

Writing – review & editing: MR PCP AT.

References

1. Hanson MA, Gluckman PD. Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? Physiol Rev. 2014; 94: 1027–1076. doi: 10.1152/physrev.00029.2013 PMID: 25287859
2. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. The Lancet. 1989; 334: 577–580.
3. Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. Reprod Toxicol. 2005; 20: 345–352. doi: 10.1016/j.reprotox.2005.04.005 PMID: 15893910
4. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? J Physiol. 2004; 561: 355–377. doi: 10.1113/jphysiol.2004.072009 PMID: 15459241
5. Fowden AL, Jellyman JK, Valenzuela OA, Forhead AJ. Nutritional Programming of Intrauterine Development: A Concept Applicable to the Horse? J Equine Vet Sci. 2013; 33: 295–304.
6. Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale PD, et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. Reprod Camb Engl. 2002; 123: 445–453.
7. Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. Reproduction. 2004; 127: 67–77. doi: 10.1530/rep.1.00024 PMID: 15056771
8. Giussani DA, Forhead AJ, Gardner DS, Fletcher AJW, Allen WR, Fowden AL. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. J Physiol. 2003; 547: 67–76. doi: 10.1113/jphysiol.2002.027409 PMID: 12562940
9. Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. J Endocrinol. 2004; 181: 459–467. PMID: 15171694
10. Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. PloS One. 2014; 9: e102044. doi: 10.1371/journal.pone.0102044 PMID: 25006665
11. Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer Into Smaller or Larger Breeds Alters Postnatal Growth and Metabolism in Weaned Horses. J Equine Vet Sci.
12. Peugnet P, Mendoza L, Wimel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, et al. Longitudinal Study of Growth and Osteoarticular Status in Foals Born to Between-Breed Embryo Transfers. J Equine Vet Sci. 2016; 37: 24–38.
13. Ousey JC, Fowden AL, Wilsher S, Allen WR. The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. Equine Vet J. 2008; 40: 673–679. PMID: 19165937
14. Wilsher S, Allen WR. Effects of a Streptococcus equi infection—mediated nutritional insult during midgestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. Equine Vet J. 2006; 38: 549–557. PMID: 17124846
15. Cavinder CA, Burns SA, Coverdale JA, Hammer CJ, Holub G, Hinrichs K. Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. Prof Anim Sci. 2012; 28: 344–350.
16. Thorson JF, Karren BJ, Bauer ML, Cavinder CA, Coverdale JA, Hammer CJ. Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: Foaling data. J Anim Sci. 2010; 88: 982–990. doi: 10.2527/jas.2008-1646 PMID: 19897623
17. George LA, Staniar WB, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. Domest Anim Endocrinol. 2009; 37: 23–29. doi: 10.1016/j.domaniend.2009.01.003 PMID: 19359126
18. Sutton EI, Bowland JP, Ratcliff WD. Influence of level of energy and nutrient intake by mares on reproductive performance and on blood serum composition of the mares and foals. Can J Anim Sci. 1977; 57: 551–558.
19. Heyden LV, Lejeune J-P, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, et al. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. Vet Rec. 2013; 172: 68–68. doi: 10.1136/vr.101034 PMID: 23118049

20. Chavatte-Palmer P, Dupont C, Debus N, Camous S. Nutritional programming and the reproductive function of the offspring. Anim Prod Sci. 2014; 54: 1166–1176.
21. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reprod Camb Engl. 2003; 125: 769–784.
22. Rae MT, Rhind SM, Fowler PA, Miller DW, Kyle CE, Brooks AN. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. Reprod Camb Engl. 2002; 124: 33–39.
23. Alejandro B, Pérez R, Pedrana G, Milton JTB, Lopez A, Blackberry MA, et al. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. Reprod Fertil Dev. 2002; 14: 333–337. PMID: 12467358
24. Genovese P, Núñez ME, Pombo C, Bielli A. Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. Reprod Domest Anim Zuchthyg. 2010; 45: 233–236.
25. Kotsampasi B, Balaskas C, Papadomichelakis G, Chadio SE. Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. Anim Reprod Sci. 2009; 114: 135–147. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.08.017 PMID: 18814977
26. Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. Reprod Camb Engl. 2001; 122: 375–383.
27. Weller MMDCA, Fortes MRS, Marcondes MI, Rotta PP, Gionbeli TRS, Valadares Filho SC, et al. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. J Dairy Sci. 2016; 99: 3056–3071. doi: 10.3168/jds.2015-9673 PMID: 26874426
28. Dupont C, Ralliard-Rousseau D, Tarrade A, Faure C, Dahirel M, Sion B, et al. Impact of maternal hyperlipidic hypercholesterolaemic diet on male reproductive organs and testosterone concentration in rabbits. J Dev Orig Health Dis. 2014; 5: 183–188. doi: 10.1017/S2040174414000087 PMID: 24901657
29. Martin-Rosset W. Nutrition et alimentation des chevaux: nouvelles recommandations alimentaires de l'INRA. Versailles: Éd. Quae; 2012.
30. REFErences—Raiseau économique de la filière équine. Annuaire écus 2015. 2015: 68.
31. Peugnet P, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, et al. Effects of Moderate Amounts of Barley in Late Pregnancy on Growth, Glucose Metabolism and Osteoarticular Status of Pre-Weaning Horses. PLoS ONE. 2015; 10: e0122596. doi: 10.1371/journal.pone.0122596 PMID: 25875166
32. National Research Council (U.S.), editor. Nutrient requirements of horses. 6th rev. ed. Washington, D. C: National Academies Press; 2007.
33. Arnaud G, Perret G, Dubroeucq H, Rivot D. Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport —Guide pratique. Quae. Institut de l'élevage; 1997.
34. Bergman RN. Toward Physiological Understanding of Glucose Tolerance: Minimal-Model Approach. Diabetes. 1989; 38: 1512–1527. PMID: 2684710
35. Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. J Clin Invest. 1981; 68: 1456–1467. doi: 10.1172/JCI110398 PMID: 7033284
36. Bergman RN. Minimal model: perspective from 2005. Horm Res Paediatr. 2006; 64: 8–15.
37. Boston RC, Stefanovski D, Moate PJ, Sumner AE, Watanabe RM, Bergman RN. MINMOD Millennium: a computer program to calculate glucose effectiveness and insulin sensitivity from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. Diabetes Technol Ther. 2003; 5: 1003–1015. doi: 10.1089/152091503322641060 PMID: 14709204
38. Hoffman RM, Boston RC, Stefanovski D, Kronfeld DS, Harris PA. Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. J Anim Sci. 2003; 81: 2333–2342. PMID: 12968709
39. Russ JC. Practical stereology. Springer; 2013.
40. Rode K, Sieme H, Richterich P, Brehm R. Characterization of the equine blood-testis barrier during tubular development in normal and cryptorchid stallions. Theriogenology. 2015; 84: 763–772. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.05.009 PMID: 26074069
41. van Weeren PR. Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). Clin Tech Equine Pract. 2006; 5: 248–258.
42. Denoix J. Sémiologie radiographique générale des articulations. Prat Vét Equine. 1990; 22: 14–27.
43. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cited 26 Jun 2016]. Available: https://www.r-project.org/
44. Escofier B, Pagès J. Multiple factor analysis (AFMULT package). Comput Stat Data Anal. 1994; 18: 121–140.

45. FactoMineR: Exploratory Multivariate Data Analysis with R [Internet]. [cited 14 Mar 2016]. Available: http://factominer.free.fr/

46. Long NM, Rule DC, Tuersunjiang N, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity in sheep increases fatty acid synthesis, upregulates nutrient transporters, and increases adiposity in adult male offspring after a feeding challenge. PloS One. 2015; 10: e0122152. doi: 10.1371/journal.pone.0122152 PMID: 25875659

47. Simitzis PE, Symeon GK, Kominakis AP, Bizelis IA, Chadio SE, Abas Z, et al. Severe maternal undernutrition and post-weaning behavior of rabbits. Physiol Behav. 2015; 141: 172–179. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.01.025 PMID: 25619951

48. Laporte-Broux B, Roussel S, Ponter AA, Giger-Reverdin S, Camous S, Chavatte-Palmer P, et al. Long-term consequences of feed restriction during late pregnancy in goats on feeding behavior and emotional reactivity of female offspring. Physiol Behav. 2012; 106: 178–184. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.02.001 PMID: 22342426

49. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, et al. The Effect of Neonatal Leptin Treatment on Postnatal Weight Gain in Male Rats Is Dependent on Maternal Nutritional Status during Pregnancy. Endocrinology. 2008; 149: 1906–1913. doi: 10.1210/en.2007-0981 PMID: 18187552

50. Attig L, Djiane J, Gertler A, Rampin O, Larcher T, Boukthir S, et al. Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal growth and development. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008; 295: E1117–1125. doi: 10.1152/ajpendo.90542.2008 PMID: 18780769

51. Bouret SG, Simerly RB. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. Clin Genet. 2006; 70: 295–301. doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00684.x PMID: 16965320

52. Symeon GK, Goliomytis M, Bizelis I, Papadomichelakis G, Pagonopoulou O, Abas Z, et al. Effects of Gestational Maternal Undernutrition on Growth, Carcass Composition and Meat Quality of Rabbit Offspring. PLoS ONE. 2015; 10: e0118259. doi: 10.1371/journal.pone.0118259 PMID: 25671602

53. Khanal P, Husted SV, Axel AMD, Johnsen L, Pedersen KL, Mortensen MS, et al. Late gestation over- and undernutrition predispose for visceral adiposity in response to a post-natal obesogenic diet, but with differential impacts on glucose-insulin adaptations during fasting in lambs. Acta Physiol Oxf Engl. 2014; 210: 110–126.

54. Laporte-Broux B, Roussel S, Ponter AA, Perault J, Chavatte-Palmer P, Duvaux-Ponter C. Short-term effects of maternal feed restriction during pregnancy on goat kid morphology, metabolism, and behavior. J Anim Sci. 2011; 89: 2154–2163. doi: 10.2527/jas.2010-3374 PMID: 21317350

55. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. Lancet Lond Engl. 1998; 351: 173–177.

56. Gardner DS, Tingey K, Van Bon BWM, Ozanne SE, Wilson V, Dandrea J, et al. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. Am J Physiol—Regul Integr Comp Physiol. 2005; 289: R947–R954. doi: 10.1152/ajpregu.00120.2005 PMID: 15961536

57. Fowden AL, Gardner DS, Ousey JC, Giussani DA, Forhead AJ. Maturation of pancreatic β-cell function in the fetal horse during late gestation. J Endocrinol. 2005; 186: 467–473. doi: 10.1677/joe.1.06176 PMID: 16135666

58. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS, Spencer HG. Predictive adaptive responses in perspective. Trends Endocrinol Metab. 2008; 19: 109–110. doi: 10.1016/j.tem.2008.02.002 PMID: 18328727

59. Bamford NJ, Potter SJ, Baskerville CL, Harris PA, Bailey SR. Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in different equine breeds adapted to cereal-rich or fat-rich meals. Vet J. 2016;

60. Carter RA, McCutcheon LJ, George LA, Smith TL, Frank N, Geor RJ. Effects of diet-induced weight gain on insulin sensitivity and plasma hormone and lipid concentrations in horses. Am J Vet Res. 2009; 70: 1250–1258. doi: 10.2460/ajvr.70.10.1250 PMID: 19795940

61. Khanal P, Axel AMD, Kongsted AH, Husted SV, Johnsen L, Pandey D, et al. Late gestation under- and overnutrition have differential impacts when combined with a post-natal obesogenic diet on glucose-lactate-insulin adaptations during metabolic challenges in adolescent sheep. Acta Physiol Oxf Engl. 2015; 213: 519–536.

62. Symonds ME, Dellschaft N, Pope M, Birtwistle M, Alagal R, Keisler D, et al. Developmental programming, adiposity, and reproduction in ruminants. Theriogenology. 2016; 86: 120–129. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.023 PMID: 27173959

63. Bell RA, Nielsen BD, Waite K, Rosenstein D, Orth M. Daily access to pasture turnout prevents loss of mineral in the third metacarpus of Arabian weanlings. J Anim Sci. 2001; 79: 1142–1150. PMID: 11374532

64. Sherman KM, Miller GJ, Wronski TJ, Colahan PT, Brown M, Wilson W. The effect of training on equine metacarpal bone breaking strength. Equine Vet J. 1995; 27: 135–139. PMID: 7607147

65. Vickers MH, Breier BH, McCarthy D, Gluckman PD. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. Am J Physiol—Regul Integr Comp Physiol. 2003; 285: R271–R273. doi: 10.1152/ajpregu.00051.2003 PMID: 12794001

66. Denoix J-M, Jacquet S, Lepeule J, Crevier-Denoix N, Valette J-P, Robert C. Radiographic findings of juvenile osteochondral conditions detected in 392 foals using a field radiographic protocol. Vet J Lond Engl 1997. 2013; 197: 44–51.

67. Kroll A, Hertsch B, Höppner S. Entwicklung osteochondraler Veränderungen in den Fessel-und Talokruralgelenken im Röntgenbild beim Fohlen. Pferdeheilkunde. 2001; 17: 489–500.

68. van Weeren PR, Sloet van Oldruitenborgh-Ooste null, Barneveld A. The influence of birth weight, rate of weight gain and final achieved height and sex on the development of osteochondrotic lesions in a population of genetically predisposed Warmblood foals. Equine Vet J Suppl. 1999; 26–30.

69. Steelman SM, Michael-Eller EM, Gibbs PG, Potter GD. Meal size and feeding frequency influence serum leptin concentration in yearling horses. J Anim Sci. 2006; 84: 2391–2398. doi: 10.2527/jas.2005-281 PMID: 16908642

70. Ralston S. Postprandial hyperglycemica/hyperinsulinemia in young horses with osteochondritis dissecans lesions. Pferdeheilkunde. 1996; 320–322.

71. Glade MJ, Belling TH Jr. A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. J Equine Vet Sci. 1986; 6: 151–155.

72. Clemmons AJ, Thompson J DL, Johnson L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. Biol Reprod. 1995; 52: 1258–67. PMID: 7632834

73. Johnson L. Efficiency of spermatogenesis. Microsc Res Tech. 1995; 32: 385–422. doi: 10.1002/jemt.1070320504 PMID: 8563040

74. Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. Anim Reprod Sci. 2008; 107: 257–267. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.014 PMID: 18524506

75. Almeida J, Conley AJ, Mathewson L, Ball BA. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. Reproduction. 2011; 141: 841–848. doi: 10.1530/REP-10-0499 PMID: 21300693

76. Almeida J, Conley AJ, Mathewson L, Ball BA. Expression of anti-Mullerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. Theriogenology. 2012; 77: 847–57. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.007 PMID: 22115811

77. Bergin WC, Gier HT, Marion GB, Coffman JR. A developmental concept of equine cryptorchism. Biol Reprod. 1970; 3: 82–92. PMID: 4398874

78. Rodriguez-Gonzalez GL, Vigueras-Villasenor RM, Millan S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz PW, et al. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. J Dev Orig Health Dis. 2012; 3: 321–6. doi: 10.1017/S2040174412000360 PMID: 25102260

79. Rhind SM. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. Anim Reprod Sci. 2004; 82–83: 169–81. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.003 PMID: 15271451

80. Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, et al. An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice. Mol Endocrinol. 2013; 27: 814–827. doi: 10.1210/me.2012-1258 PMID: 23518924

81. Gao Y, Lee WM, Cheng CY. Thyroid Hormone Function in the Rat Testis. Front Endocrinol. 2014; 5.

1.2. Article 2 : Placental function and structure at term is altered in broodmares fed with cereals from mid-gestation

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Cédric Dubois, François Piumi, Luc Jouneau, Olivier Bouchez, Marie-Christine Aubrière, Michèle Dahirel, Josiane Aioun, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer.

Article soumis à Placenta, accepté avec corrections mineures.

Cette publication présente les effets d'une supplémentation en concentrés à partir du 7ème mois de gestation jusqu'au poulinage ou d'un régime uniquement composé de fourrages durant la gestation sur la structure et la fonction placentaire à terme.

- La **structure placentaire** a été analysée par stéréologie et mesures d'épaisseur et de surface,
- La **fonction placentaire** a été analysée par RNA sequencing (RNAseq), en comparant les expressions de gènes « gène par gène » et en utilisant la méthode Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Cet article montre que la supplémentation de la ration avec des concentrés durant la deuxième partie de la gestation entraine des altérations de la vascularisation placentaire associées à une surexpression des gènes impliqués dans l'inflammation et la vascularisation. Ces observations sont à l'image de ce qui est observé dans les placentas de femmes obèses et/ou en diabète gestationnel et de juments souffrant de fourbure. Il s'agit aussi de la première étude transcriptomique publiée sur l'étude de la fonction placentaire chez le cheval.

Placental function and structure at term is altered in broodmares fed with cereals from mid-gestation

M. Robles[1], P. Peugnet[1], C. Dubois[2], F. Piumi[1], L. Jouneau[1], O. Bouchez[3], MC. Aubrière[1], M. Dahirel[1], J. Aioun[1], L. Wimel[2], A. Couturier-Tarrade[1], P. Chavatte-Palmer[1]
[1]UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France
[2]IFCE, Station Expérimentale de la Valade, Chamberet, France
[3]INRA, US 1426, GeT-PlaGe, Genotoul, Castanet-Tolosan, France

Abstract

Introduction: Feeding pregnant broodmares with cereal concentrates has been shown to increase maternal insulin resistance and affect foal metabolism in the short and long-term. These effects are likely to be mediated by the placenta. Here, we investigated feto-placental biometry and placental structure and function at term in mares fed with or without cereals concentrates.

Material and methods: From 7 months of gestation, 22 multiparous mares were fed forage only (group F (n=12)) or received forage and cracked barley (group B (n=10)) until foaling. Foals and placentas were weighed and placental samples were collected above the umbilical cord insertion at birth. Placental histological structure was studied by stereology. A RNAseq analysis was performed on 9 placentas of each group. Enrichment of gene sets was analysed using the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software using the KEGG and GO databases.

Results: No difference in feto-placental biometry was observed between groups. The volume of microcotyledonary vessels was decreased in B placentas and the vascular wall of allantoic arterioles was thickened. Gene sets involved in neutral amino acids, folate and anions transport and fatty acids, cholesterol and folate degradation were down-regulated while gene

sets involved in RNA expression, inflammation and vascularisation were up-regulated in B placentas.

Conclusion: Feeding pregnant mares with concentrates from mid-gestation alters the placental function and structure as observed in other species in cases of maternal insulin resistance.

Acknowledgments: This work was funded by grants from the "Institut Français du Cheval et de l'Equitation" and by the "Fonds Eperon" (FOETALIM project). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, nor preparation of the manuscript. The authors are grateful to the staff of the Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) experimental farm (Domaine de la Valade, Chamberet, France) for care and management of animals.

1. Introduction

Since the early nineties, epidemiological studies in the Human species and experimental studies in model animals demonstrated that alterations of the maternal environment from periconception affects offspring development and health at adulthood [1]. This concept, called Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD), has also been demonstrated in the equine species [2].

In the horse, placentation is diffuse and epitheliochorial. The haemotrophic exchanges between maternal and fetal blood occur through the placental microcotyledons, that are intensely branched vascular structures covered with a haemotrophic trophoblast. The microcotyledons form interdigitations with the maternal endometrium to maximize nutrient exchanges. Additionally, histotrophic exchanges are mediated by pseudo-stratified trophoblastic cells specialized in the transfer of nutrients secreted by the uterine glands and take place across areolae located in-between the microcotyledons [3–5].

In the equine industry, breeders often feed broodmares with cereals in late pregnancy. In two previous studies, we demonstrated that feeding broodmares with cereals from mid-gestation increases maternal insulin resistance and the development of osteochondrosis in the foals, with potential detrimental effects on the horse industry economy [6,7]. Nevertheless, no studies have yet been conducted to understand the effect on the structure and function of the placenta. The present study follows up these previous works and investigates the effects of feeding broodmares with a moderate amount of cereals from mid-gestation on the structure and function of the placenta at term. Placentas were measured at delivery and their structure was analyzed using the stereology method and the ImageJ software. Placental function was assessed through the analysis of gene expression after RNA sequencing.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The animal studies received ethical approval from the local ethics committee (« Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale du Limousin ») under protocol number 5-2013-5.

Twenty-two multiparous Saddlebred mares (median age 9y; range 6-19y) were fed cracked barley and forage (B, n=10) or forage only (F, n=12) from the 7th month of gestation until foaling. Management of mares from insemination to parturition has been previously described by Peugnet *et al*. [6]. In the present work, compared to previously presented [6], 2 mares (1 of each group) were removed from the results analysis due to pathology (metabolic syndrome) and age (25y old).

2.2. Placental biometry

Before suckling, foals were weighed. After delivery, the placenta (allantochorion) was immediately weighed. Placental efficiency was also determined by calculating the foal birthweight to placenta weight ratio. Placentas were laid in the "F" configuration, revealing both uterine horns and the uterine body. A clear Plexiglas sheet marked with 10cmx10cm squares was applied above the placenta and photographed. The placental gross surface was subsequently measured on the photographs of the using the ImageJ® software (National Institute of Health) as previously described [8]. Placental volume was evaluated using a graduated water container, by measuring the volume of water displaced after immersing the placenta into the water.

Placental samples were collected within 30 minutes of delivery above the umbilical cord insertion. Aliquots (N=3 for each procedure) were either fixed in 4% formaldehyde for histological analysis or snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for transcriptomic analysis.

2.3. Histological and stereological analyses

Placental samples were embedded in paraffin. Sections (7µm) were stained with hematoxylin/eosin for stereological analysis and scanned using NanoZoomer Digital Pathology® (Hamamatsu Photonics).

Surface densities (Sv) and Volume fractions (Vv) of the different components of the allantochorion, *i.e.*, microcotyledons and allantois, were quantified by One stop stereology using the Mercator® software (ExploraNova, France, [9]).

As shown in Figure 1, the components measured were:

- **In the microcotyledonary region:** haemotrophic trophoblast, microcotyledonary vessels, connective tissue and microcotyledons as the sum of all microcotyledonary components.
- **In the allantoic region:** histotrophic trophoblast and allantoic vessels. The chorionic mesoderm and allantoic connective tissue were merged as allantoic connective tissue.

Vv and Sv were multiplied by the total volume of the placenta to obtain an estimation of the absolute volume (cm^3) and surface (cm^2) of the components of the allantochorion.

For each placenta, 12 allantoic arterioles were randomly selected. The surface area of the lumen (calculated using transverse diameters) and the thickness of the vascular wall were measured using the ImageJ® software (National Institute of Health).

2.4. Statistical analyses of feto-placental biometry and placental morphometry

Results are expressed as median [quartile 1 – quartile 3] and presented as boxplots (median and interquartile range (IQR)). Statistical analyses were performed using the R software (http://www.r-project.org, version 3.4.0.).

Data were analysed using a mixed linear model (nlme package [10]) followed by a type 3 Anova (car package [11]) considering group of the mare and sex of the foal as fixed effects. Mare's age at insemination was considered as random effect.

Effects were considered significant when $p<0.05$.

2.5. Transcriptomic analyses

9 placentas of each group were selected considering the sex of the foal and the age of the mare (F: 5 females and 4 males, median mare's age 8 (range 6-19); B: 4 females and 5 males, median mare's age 8 (range 6-17)).

Total RNA from placental samples was isolated as previously described [12] and purified using a RNeasy Mini kit 250 (Qiagen, Netherlands) according to the manufacturer's instructions.

RNA quality and quantity were analysed with a bioanalyzer system (2100 bioanalyzer system, Agilent Techonogies, USA) using a RNA 6000 nano kit according to the manufacturer's instructions. The RNA samples had a RNA Integrity Number median of 7.6 (range 6.9 to 8.8).

Reverse transcription was performed as previously described [13].

The 18 cDNA libraries were sequenced using a HiSeq 3000 sequencing system (Illumina, USA) as 150bp 2x paired-end reads in three technical replicates. The quality control check of the raw reads was performed with FastQC (version 0.11.2). Adapter sequences were removed from sequencing reads with Cutadapt command-line program (version 1.8.3) [14]. Reads were then mapped to the equine genome (Equus caballus version 82.2) using the splice junction

mapper TopHat (version 2.0.14) [15] associated with the short-read aligner Bowtie2 (version 2.1.0) [16]. Finally, featureCounts (version 1.4.5) [17] was used to summarize at the gene level the number of aligned reads per exon using the Ensembl annotation of the equine genome. The featureCounts multi-mapping (-m) option was applied to count every alignment reported for a multi-mapping read *i.e.* reads mapping to more than one genomic location with the same similarity score. Ensembl gene IDs were used in the output file to identify the number of read counts per gene.

Data normalization and single-gene level analysis of the differential expression between B and F placentas were performed using the DESeq2 package on the R software [18]. Results were considered statistically significant when adjusted $p < 0.05$.

A Gene set Enrichment Analysis (GSEA) was performed to identify biological pathways enriched in genes positively or negatively correlated with cereal supplementation [19,20]. GSEA was set using the following parameters: 1000 gene set permutation, weighed enrichment statistics, gene set size between 15 and 500 and signal-to-noise metrics. C2:KEGG (The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), C5:Bp (Gene ontology(GO), Biological Processes), C5:Cc (GO, Cellular Component) and C5:Mf (GO, Molecular Function) databases were used to identify the top 15 pathways characterizing each group. Regulated pathways were considered statistically significant when the false discovery rate (FDR) q-value was <0.05. The GSEA-derived normalized enrichment score (NES) was used for the visualisation of pathways' regulation.

3. Results

3.1. Feto-placental biometry

At parturition, no difference was observed between groups for birthweight nor for placental weight, surface, volume and efficiency. Females tended to be heavier than males (+14.3%, p=0.05) and had a heavier placenta (+5.5%, p=0.049).

3.2. Placental morphometry

Stereological results are shown in Table 1.

- **Microcotyledonary region**: No difference in volume and surface was observed between both groups for haemotrophic trophoblast and connective tissue. The volume of microcotyledonary vessels, however, was decreased in B *vs* F placentas (-29.6%, p=0.02).

  The volume and surface of microcotyledonary vessels (+27.8%, p<0.01, 26.9%, p<0.0001, respectively) and connective tissue (+43.6%, p=0.02, 42.4%, p<0.01, respectively) were increased in females *vs* males. The volume of haemotrophic trophoblast (+36.6%, p=0.01) and of microcotyledons (+35.9%, p<0.01) was also increased in females *vs* males.

- **Allantoic region**: No difference in surface and volume was observed between groups for all components of the allantois.

  The surface of the histotrophic trophoblast was increased (+35.9%, p<0.01) in females *vs* males.

B placentas had a lower arteriole lumen surface area (-51.1%, p=0.01) and an increased arteriole vascular wall thickness (+65.3%, p<0.0001) than F placentas. Results are presented in Figure 2.

3.3. Transcriptomic analyses

Using the single gene level analysis, no difference was observed between B and F placentas. The normalized enrichment scores of the 15 most differentially regulated pathways are presented in Figure 3. The list of the 15 most differentially regulated gene-sets at $q<0.05$ for each database, sorted by up- and down-regulation and by cellular function is presented in Table 2.

According to the GSEA method, altogether 193 gene sets were upregulated (15 KEGG, 144 GOBp, 12 GOMf, 22 GOCc) and 8 gene sets were downregulated in B placentas (2 KEGG, 2 GOBp, 3 GOMf, 1 GOCc).

The gene sets upregulated in B placentas were involved in **inflammation**: gene-sets involved in activation and recruitment of immune cells and production of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors, MAPK signalling and collagen production, **vascularisation**: gene-sets involved in angiogenesis, notch signalling pathway, endothelium development and smooth muscle cell differentiation, and **protein production and transport**.

The gene sets downregulated in B placentas were involved in **cell transport**: neutral amino acids, folate and anions transport and intracellular transport, **cell catabolism**: amino acids degradation, fatty acids oxidation and acetyl-coA, cholesterol and folate degradation, and **keratins production**.

4. Discussion

In the present study, feeding pregnant mares with cereals from mid-gestation affected the structure and function of the placenta at term.

We observed previously that broodmares fed with cereals were more insulin resistant in late gestation and maintained an hyperglycaemic state throughout the day compared to mares fed with forages only [6]. Compared to F mares, the placentas of B mares had a reduced volume

of microcotyledonary vessels associated with a thickening of the vascular wall of the allantoic arterioles. These alterations were associated with upregulated gene sets involved in inflammation, production and transport of proteins and vascularisation. Moreover, gene-sets downregulated in B placentas were involved in cell transport, as well as amino acid, fatty acid, and cholesterol catabolism, folate degradation and keratin production.

To our knowledge, this is the first RNAseq study of the horse placenta at term. Therefore, transcriptomic results are discussed against studies performed in human pregnancies.

At birth, no difference was observed for foal and placental measurements between groups. To date, however, only very strong alterations of maternal environment have been shown to affect biometric measurements at birth in the horse [21–23]. This relative resistance to the direct effects of maternal environment might be due to the fact that the villi of the horse placenta grow throughout gestation, thus enabling placental adaptation of nutrient [4].

B placentas had a lower volume of microcotyledonary vessels, associated with a thickening of the vascular wall and a decreased area of the lumen of allantoic arterioles.

These alterations of placental vasculature were associated with the upregulation of gene sets involved in inflammation, vascularisation, coagulation and collagen production. Interestingly, similar changes are observed in the placenta of insulin resistant women, but also of broodmares with laminitis, a condition defined as hoof inflammation resulting in the rotation of the pedal bone and lameness, which is commonly associated with overweight, peripheral insulin resistance and vascular dysfunction [24–26]. First, in terms of structure, vascular walls are thicker with a larger muscular layer in placentas of diabetic and or obese women and in placentas of laminitic broodmares (insulin resistant) [23,27,28]. In terms of gene expression, **i**ncreased expression of genes involved in inflammation is commonly observed in placentas of

diabetic and/or obese women [28–35] whereas the upregulation of genes involved in vascularization is observed in placentas of diabetic women only [29]. Finally, the upregulation of genes involved in collagen production is observed in placentas of diabetic women and associated with condensation of collagen material around the vessels [27]. In the present study, we were not able to observe any accumulation or condensation of collagen material using hematoxylin/eosin/saffron nor Masson trichrome staining.

According to Radaelli *et al*., (2003), in women, the primary response to diabetes is the recruitment of pro-inflammatory cytokines, leading to an increased production of extracellular matrix components and the subsequent enhanced vascularisation activity and endothelial differentiation in the placenta [29]. These results correspond to the functional alterations of the B placentas. Moreover, the increased expression of pro-inflammatory and pro-coagulant factors is associated with dysfunction of the endothelium in diabetes and increased proliferation of vascular smooth muscle cells [36].

Clinically, these alterations are linked with loss of blood vessel elasticity [37] and impaired vasorelaxation [36] that may affect nutrient exchange in B placentas and then program the long term phenotype of the offspring.

Finally, amino acids, folate and anions transport, amino acids, fatty acids, cholesterol and folate catabolism and keratin production were downregulated in B placentas. As F mares were fed only with forage very poor in soluble carbohydrates but rich in fibres, it is then not surprising to observe that the placental cells mainly rely on the amino acids and fatty acids catabolism to produce energy. Folate degradation leads to production of methionine and potentially to DNA methylation and repression of gene expression [38]. Then, the decreased expression of genes involved in folate degradation in B placenta may be associated with a decreased repression of gene expression and with the high number of upregulated genes in

these placentas. The decreased expression of genes involved in cholesterol degradation may also regulate steroid hormone synthesis [39], but sexual hormones plasma concentrations were not explored in the present study. Finally, KO mice for all the keratin filament display placental hypoxia, impaired vasculogenesis and infiltration of natural killer cells [40]. Then the downregulation of expression of keratin genes may be reflected in B placentas by the altered structure and function of the vessels and the increased inflammation.

4.1. Main limitations

The main limitation of this work is that placental samples were collected above the cord insertion only. It has been shown previously that placental structure was different according to the placental region (placental body, pregnant or non-pregnant horn) [41,42]. But to our knowledge, no work has been conducted to study the capacity of adaptation and the response of these different regions to maternal environment modifications. Moreover, no study has been conducted on the differences of placental function between the different placental regions. The region that we chose to study in the present study may then not be representative of the whole organ. This could explain the lack of difference of placental efficiency and foals' growth *in utero* despite the alterations of placental structure and function.

5. Conclusion

In conclusion, feeding the pregnant mares with cereals from mid gestation alters the feto-maternal exchanges in the placenta by affecting the placental structure and function of the vessels and increasing the placental inflammation. Modifications of placental structure and function observed in placentas of insulin resistant dams are similar to those observed in diabetic and/or obese women and laminitic broodmares.

6. Bibliography

[1] M. Hanson, P. Gluckman, Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?, Physiol. Rev. 94 (2014) 1027–76. doi:10.1152/physrev.00029.2013.

[2] P. Peugnet, M. Robles, L. Wimel, A. Tarrade, P. Chavatte-Palmer, Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring, Theriogenology. 86 (2016) 99–109. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.028.

[3] W.R. Allen, F. Stewart, Equine placentation, Reprod. Fertil. Dev. 13 (2001) 623. doi:10.1071/RD01063.

[4] A. Macdonald, P. Chavatte, A. Fowden, Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (Equus caballus) in the latter half of gestation, Placenta. 21 (2000) 565–574. doi:10.1053/plac.2000.0510.

[5] D. Steven, C. Samuel, Anatomy of the placental barrier in the mare., J. Reprod. Fertil. 23 (1975) 579–82.

[6] P. Peugnet, M. Robles, L. Mendoza, L. Wimel, C. Dubois, M. Dahirel, D. Guillaume, S. Camous, V. Berthelot, M.-P. Toquet, E. Richard, C. Sandersen, S. Chaffaux, J.-P. Lejeune, A. Tarrade, D. Serteyn, P. Chavatte-Palmer, Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre- weaning horses, PLoS One. 10 (2015) e0122596. doi:10.1371/journal.pone.0122596.

[7] M. Robles, C. Gautier, L. Mendoza, P. Peugnet, C. Dubois, M. Dahirel, J.-P. Lejeune, I. Caudron, I. Guenon, S. Camous, A. Tarrade, L. Wimel, D. Serteyn, H. Bouraima-Lelong, P. Chavatte-Palmer, Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up

to two years, PLoS One. 12 (2017) e0169295. doi:10.1371/journal.pone.0169295.

[8] W. Allen, S. Wilsher, C. Turnbull, F. Stewart, J. Ousey, P. Rossdale, A. Fowden, Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero, Reproduction. 172 (2002) 445–453. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882022 (accessed 19 February 2017).

[9] M. Reed, C. Howard, G. DE Yanés, One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers, J. Microsc. 239 (2010) 54–65. doi:10.1111/j.1365-2818.2009.03356.x.

[10] J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, Core Team R, nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models., R Packag. Version 2.1-131. (2017). https://cran.r-project.org/package=nlme.

[11] J. Fox, S. Weisberg, An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition, Sage, 2011.

[12] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal. Biochem. 162 (1987) 156–159. doi:10.1006/abio.1987.9999.

[13] A. Tarrade, D. Rousseau-Ralliard, M.-C. Aubrière, N. Peynot, M. Dahirel, J. Bertrand-Michel, T. Aguirre-Lavin, O. Morel, N. Beaujean, V. Duranthon, P. Chavatte-Palmer, Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model, PLoS One. 8 (2013) e83458. doi:10.1371/journal.pone.0083458.

[14] M. Martin, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, EMBnet.journal. 17 (2011) 10. doi:10.14806/ej.17.1.200.

[15] D. Kim, G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, S.L. Salzberg, TopHat2: accurate

alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions, Genome Biol. 14 (2013) R36. doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36.

[16] B. Langmead, S.L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, Nat. Methods. 9 (2012) 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.

[17] Y. Liao, G.K. Smyth, W. Shi, featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, Bioinformatics. 30 (2014) 923–930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656.

[18] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2., Genome Biol. 15 (2014) 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

[19] A. Subramanian, P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, A. Paulovich, S.L. Pomeroy, T.R. Golub, E.S. Lander, J.P. Mesirov, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 15545–50. doi:10.1073/pnas.0506580102.

[20] V.K. Mootha, C.M. Lindgren, K.-F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstråle, E. Laurila, N. Houstis, M.J. Daly, N. Patterson, J.P. Mesirov, T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, D. Altshuler, L.C. Groop, PGC-1α-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, Nat. Genet. 34 (2003) 267–273. doi:10.1038/ng1180.

[21] P. Peugnet, L. Mendoza, L. Wimel, G. Duchamp, C. Dubois, F. Reigner, I. Caudron, B. Deliège, M.-P. Toquet, E. Richard, S. Chaffaux, A. Tarrade, J.-P. Lejeune, D. Serteyn, P. Chavatte-Palmer, Longitudinal Study of Growth and Osteoarticular Status in Foals

Born to Between-Breed Embryo Transfers, J. Equine Vet. Sci. 37 (2016) 24–38. doi:10.1016/j.jevs.2015.11.008.

[22] S. Wilsher, W. Allen, Effects of a Streptococcus equi infection--mediated nutritional insult during mid-gestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development., Equine Vet. J. 38 (2006) 549–557. doi:10.2746/042516406X156497.

[23] F.M. Pazinato, R. Curcio, C.G. Fernandes, S. Antonio, C.A. Santos, L.S. Feij, Histomorphometry of the placental vasculature and microcotyledons in Thoroughbred mares with chronic laminitis, Theriogenology. 91 (2017) 77–81. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.009.

[24] M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, Laminitis in the horse: a review, Vet. Q. 21 (1999) 121–127. doi:10.1080/01652176.1999.9695006.

[25] R.A. Morgan, J.A. Keen, B.R. Walker, P.W.F. Hadoke, S. Elliot, S. Longhofer, Vascular Dysfunction in Horses with Endocrinopathic Laminitis, PLoS One. 11 (2016) e0163815. doi:10.1371/journal.pone.0163815.

[26] R. Geor, Metabolic predispositions to laminitis in horses and ponies : obesity , insulin resistance and metabolic syndromes, J. Equine Vet. Sci. 28 (2008) 753–759. doi:10.1016/j.jevs.2008.10.016.

[27] L. Pietro, S. Daher, M.V.C. Rudge, I.M.P. Calderon, D.C. Damasceno, Y.K. Sinzato, C. Bandeira, E. Bevilacqua, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women., Placenta. 31 (2010) 770–80. doi:10.1016/j.placenta.2010.07.003.

[28] K.A. Roberts, S.C. Riley, R.M. Reynolds, S. Barr, M. Evans, A. Statham, K. Hor, H.N. Jabbour, J.E. Norman, F.C. Denison, Placental structure and in fl ammation in

pregnancies associated with obesity, Placenta. 32 (2011) 247–254. doi:10.1016/j.placenta.2010.12.023.

[29] T. Radaelli, A. Varastehpour, P. Catalano, S. Hauguel-de Mouzon, Gestational Diabetes Induces Placental Genes for Chronic Stress and Inflammatory Pathways, Diabetes. 52 (2003). http://diabetes.diabetesjournals.org/content/52/12/2951.short (accessed 19 July 2017).

[30] D.A. Enquobahrie, M.A. Williams, C. Qiu, M. Meller, T.K. Sorensen, Global placental gene expression in gestational diabetes mellitus, Am. J. Obstet. Gynecol. 200 (2009) 206.e1-206.e13. doi:10.1016/j.ajog.2008.08.022.

[31] E.K. Hayes, D.R. Tessier, M.E. Percival, A.C. Holloway, J.J. Petrik, A. Gruslin, S. Raha, Trophoblast Invasion and Blood Vessel Remodeling Are Altered in a Rat Model of Lifelong Maternal Obesity, Reprod. Sci. 21 (2014) 648–657. doi:10.1177/1933719113508815.

[32] J. Challier, S. Basu, T. Bintein, K. Hotmire, J. Minium, P. Catalano, S. Hauguel-de Mouzon, Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta, Placenta. 29 (2008) 274–281. doi:10.1016/j.placenta.2007.12.010.Obesity.

[33] S. Altmäe, M. Segura, F. Esteban, S. Bartel, P. Brandi, M. Irmler, J. Beckers, H. Demmelmair, C. López-Sabater, B. Koletzko, S. Krauss-Etschmann, C. Campoy, Maternal Pre-Pregnancy Obesity Is Associated with Altered Placental Transcriptome, PLoS One. 12 (2017) e0169223. doi:10.1371/journal.pone.0169223.

[34] J. Saben, F. Lindsey, Y. Zhong, K. Thakali, T.M. Badger, A. Andres, H. Gomez-Acevedo, K. Shankar, Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment., Placenta. 35 (2014) 171–7. doi:10.1016/j.placenta.2014.01.003.

[35] J. Saben, Y. Zhong, H. Gomez-Acevedo, K.M. Thakali, S.J. Borengasser, A. Andres, K. Shankar, Early growth response protein-1 mediates lipotoxicity-associated placental inflammation: role in maternal obesity., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 305 (2013) E1-14. doi:10.1152/ajpendo.00076.2013.

[36] C.M. Sena, A.M. Pereira, R. Seiça, Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1832 (2013) 2216–2231. doi:10.1016/j.bbadis.2013.08.006.

[37] D. Vranes, M.E. Cooper, R.J. Dilley, Cellular Mechanisms of Diabetic Vascular Hypertrophy, (n.d.). http://ac.els-cdn.com/S0026286298921070/1-s2.0-S0026286298921070-main.pdf?_tid=d0fc4060-6c7d-11e7-842e-00000aab0f02&acdnat=1500467509_c849707715765fcb277ba75009fc70a2 (accessed 19 July 2017).

[38] N. Zhang, Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals, Anim. Nutr. 1 (2015) 144–151. doi:10.1016/j.aninu.2015.09.002.

[39] M. Grzesiak, K. Knapczyk-Stwora, I. Wieciech, A. Golas, M. Slomczynska, Flutamide Influences Placental Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C1 (AKR1C1) Expression in Pigs, Reprod. Domest. Anim. 49 (2014) e12–e16. doi:10.1111/rda.12263.

[40] C. Kröger, P. Vijayaraj, U. Reuter, R. Windoffer, D. Simmons, L. Heukamp, R. Leube, T.M. Magin, Placental Vasculogenesis Is Regulated by Keratin-Mediated Hyperoxia in Murine Decidual Tissues, Am. J. Pathol. 178 (2011) 1578–1590. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.055.

[41] M. Oikawa, T. Yoshihara, M. Kaneko, T. Yoshikawa, Morphology of equine allantochorion at the tip of the pregnant horn, J. Comp. Pathol. 103 (1990) 343–349. doi:10.1016/S0021-9975(08)80055-2.

[42] M.G. Meirelles, M.M. Veras, M.A. Alonso, C. de Fátima Guimarães, M. Nichi, C.B. Fernandes, Influence of maternal age and parity on placental structure and foal characteristics from birth up to two years of age, J. Equine Vet. Sci. (2017). doi:10.1016/j.jevs.2017.03.226.

Table 1. Volume and surface of the different components of the placenta measured using the stereology method in term placentas of mares fed with forage only (F, n=11) or with forage and concentrates (B, n=9) from mid-gestation.

Placental component	F group (n=11)	B group (n=9)	p Group	Females (n=12)	Males (n=8)	p Sex
Umbilical cord						
Microcotyledonary part						
Volume (cm^3)						
Haemotrophic trophoblast	587.1 [474.5-768.0]	553.9 [407.1-606.7]	NS	**596.9 [531.3-737.4]**	**437.8 [337.7-615.9]**	**<0.01**
Microcotyledonary vessels	**607.0 [385.4-681.5]**	**427.7 [331.6-455.6]**	**0.02**	**531.6 [378.6-674.6]**	**415.4 [321.4-452.2]**	**0.01**
Microcotyledonary connective tissue	304.6 [180.7-373.7]	246.9 [225.3-280.5]	NS	**292.3 [241.5-362.4]**	**203.5 [151.9-287.7]**	**0.02**
Microscopic area of feto-maternal contact	794.9 [643.3-923.1]	789.7 [572.9-914.6]	NS	**830.5 [695.5-938.7]**	**611.1 [489.4-820.9]**	**<0.01**
Surface (cm^2)						
Haemotrophic trophoblast	$8.6.10^5$ [$6.3.10^5$-$11.0.10^5$]	$9.2.10^5$ [$7.1.10^5$-$10.1.10^5$]	NS	$9.3.10^5$ [$7.6.10^5$-$11.6.10^5$]	$7.6.10^5$ [$5.7.10^5$-$9.4.10^5$]	NS
Microcotyledonary vessels	$7.3.10^5$ [$5.9.10^5$-$10.3.10^5$]	$8.0.10^5$ [$6.3.10^5$-$8.1.10^5$]	NS	**$8.5.10^5$ [$7.0.10^5$-$10.7.10^5$]**	**$6.7.10^5$ [$5.3.10^5$-$7.5.10^5$]**	**<0.0001**
Microcotyledonary connective tissue	$4.3.10^5$ [$3.0.10^5$-$5.8.10^5$]	$4.4.10^5$[$3.6.10^5$-$4.5.10^5$]	NS	**$4.7.10^5$ [$4.1.10^5$-$5.6.10^5$]**	**$3.3.10^5$ [$2.6.10^5$-$4.1.10^5$]**	**<0.001**
Microscopic area of feto-maternal contact	$9.6.10^5$ [$7.3.10^5$-$11.7.10^5$]	10.10^5 [$8.0.10^5$-$10.9.10^5$]	NS	$10.2.10^5$ [$8.3.10^5$-$12.4.10^5$]	$8.2.10^5$ [$6.2.10^5$-$10.0.10^5$]	0.07
Allantoic part						
Volume (cm^3)						
Histotrophic trophoblast	147.7 [119.2-216.6]	222.3 [158.5-277.5]	NS	216.56 [161.3-256.5]	129.7 [120.4-174.5]	0.05
Allantoic vessels	247.3 [192.7-323.5]	213.9 [178.2-315.2]	NS	218.4 [175.9-286.2]	288.6 [204.5-334.7]	NS
Allantoic connective tissue	1487.3 [1235.5-1864.4]	1265.5 [1117.4-1526.1]	NS	1388.2 [1125.2-1858.2]	1416.1 [1185.9-1561.9]	NS
Surface (cm^2)						
Histotrophic trophoblast	$0.72.10^5$ [$0.64.10^5$-$1.0.10^5$]	$0.75.10^5$ [$0.66.10^5$-$0.88.10^5$]	NS	**$0.87.10^5$ [$0.72.10^5$-$1.2.10^5$]**	**$0.64.10^5$ [$0.53.10^5$-$0.70.10^5$]**	**<0.01**
Allantoic vessels	$0.9.10^5$ [$0.6.10^5$-$1.1.10^5$]	$0.7.10^5$ [$0.6.10^5$-$0.8.10^5$]	NS	$0.71.10^5$ [$0.60.10^5$-$1.1.10^5$]	$0.79.10^5$ [$0.61.10^5$-$0.95.10^5$]	NS
Allantoic connective tissue	$2.7.10^5$ [$2.1.10^5$-$3.3.10^5$]	$2.4.10^5$ [$2.1.10^5$-$2.7.10^5$]	NS	$2.4.10^5$ [$2.0.10^5$-$2.8.10^5$]	$2.6.10^5$ [$2.2.10^5$-$3.2.10^5$]	NS

Table 2. Name, normalised enrichment score (NES) and FDR q value of the 15 most differentially regulated gene-sets from the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG), gene ontology (GO) biological processes (Bp), molecular function (Mf) and cellular component (Cc) databases. Gene-set are sorted by cellular function and may then be present within two different categories.

Database	Name	NES	FDR q value
Gene sets upregulated in B placentas			
Inflammation			
C2:KEGG	Primary immunodeficiency	1.96	<0.01
	Complement and coagulation cascades	1.89	0.01
	Systemic lupus erythematosus	1.87	0.01
	Autoimmune thyroid disease	1.84	0.02
	Intestinal immune network for IgA production	1.79	0.03
	Cell adhesion molecules CAMS	1.75	0.03
	Natural killer cell mediated cytotoxicity	1.76	0.04
	Neuroactive ligand receptor interaction	1.71	0.04
	Hematopoietic cell lineage	1.68	0.04
	Cytokine cytokine receptor interaction	1.68	0.04
	Focal adhesion	1.69	0.046
	MAPK signalling pathway	1.68	0.047
	ECM receptor interaction	1.71	0.048
C5:GO Bp	Regulation of cytosolic calcium ion concentration	2.16	<0.01
	Platelet activation	2.06	<0.01
	Negative regulation of tumour necrosis factor superfamily cytokine production	2.03	<0.01
C5:GO Mf	Receptor activity	2.01	<0.01
	Transforming growth factor beta binding	2.02	0.01
	Signalling receptor activity	2.07	0.01
	Growth factor binding	2.03	0.01
	Integrin binding	1.93	0.02
	Peptide receptor activity	1.91	0.02
	Receptor signalling complex scaffold activity	1.93	0.02
	G protein coupled receptor activity	1.89	0.03
	Signal transducer activity	1.86	0.03
	Voltage gated calcium channel activity	1.83	0.047
	Cytokine receptor activity	1.81	0.047
	Cytokine binding	1.82	0.048
C5:Go Cc	Extracellular matrix component	2.07	<0.01
	Complex of collagen trimers	2.08	<0.01
	Proteinaceous extracellular matrix	1.99	<0.01
	Basement membrane	1.98	<0.01
	Collagen trimer	1.97	<0.01
	Platelet alpha granule lumen	2.09	<0.01
	Platelet alpha granule	1.91	<0.01
	Extracellular matrix	1.90	<0.01
	Heterodimeric G protein complex	1.84	0.01
	Receptor complex	1.81	0.02
Vascularisation			
C5:GO Bp	Cardiac septum morphogenesis	2.32	<0.0001
	Sprouting angiogenesis	2.27	<0.0001
	Angiogenesis	2.28	<0.001
	Blood vessel morphogenesis	2.23	<0.001
	Notch signalling pathway	2.21	<0.001
	Vasculature development	2.20	<0.001
	Cardiac chamber morphogenesis	2.14	<0.01
	Vasculogenesis	2.14	<0.01
	Ventricular septum morphogenesis	2.09	<0.01
	Endothelium development	2.07	<0.01
	Smooth muscle cell differentiation	2.08	<0.01

	Cardiac septum development	2.03	<0.01
C5:GO Mf	Growth factor binding	2.03	0.01
	Peptide receptor activity	1.91	0.02
	G protein coupled receptor activity	1.89	0.03
	Signal transducer activity	1.86	0.03
	Protein production and transport		
C2:KEGG	Ribosome	2.14	<0.0001
C5:GO Cc	Cytosolic ribosome	2.03	<0.01
	Secretory granule lumen	1.96	<0.01
	Cytosolic large ribosomal subunit	1.90	<0.01
	Cytosolic small ribosomal subunit	1.82	0.02
	Vesicle lumen	1.82	0.02
	Gene sets downregulated in B placentas		
	Cell transport of amino acids, folate and anions		
C5:GO Bp	Sulfure compound transport	-2.20	0.02
C5:GO Mf	Sulfure compound transmembrane transporter activity	-2.18	0.01
	GDP binding	-2.01	0.03
	Cell catabolism		
C2:KEGG	Propanoate metabolism	-2.01	0.02
	One carbon pool by folate	-1.93	0.02
C5:GO Bp	Bile acid metabolic process	-2.14	0.02
C5:GO Mf	Fatty acyl coA binding	-2.01	0.048
	Keratins production		
C5:GO Cc	Keratin filament	-2.08	0.03

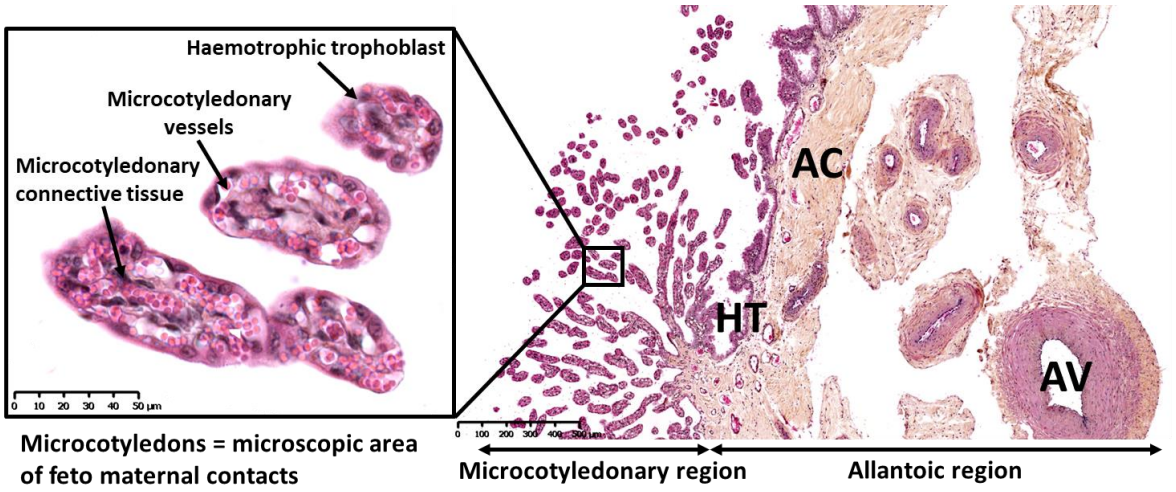


Figure 1: Structure of the horse placenta at term and placental components measured by stereology.

AC: Allantoic connective tissue, AV: Allantoic vessel, HT : Histotrophic trophoblast.

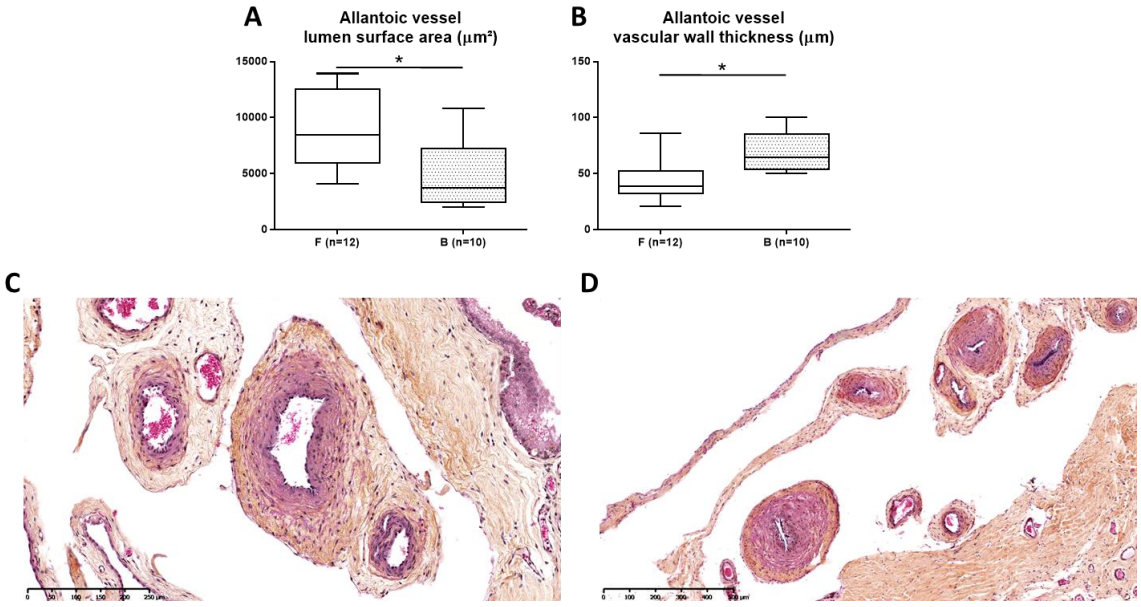


Figure 2: Arteriole lumen area and vascular wall thickness in the allantois of term placentas of mares fed with forage only or with forage and concentrates from mid-gestation. A. Allantoic arteriole lumen surface area (µm²) in F (n=12) and B (n=10) placentas. B. Allantoic vessel vascular wall thickness (µm) in F (n=12) and B (n=10) placentas. C. Allantoic arterioles in the term placenta of a F mare (Haematoxylin eosin saffron staining). D. Allantoic arterioles in the term placenta of a B mare with vascular wall thickening and reduced lumen (Haematoxylin eosin saffron staining).

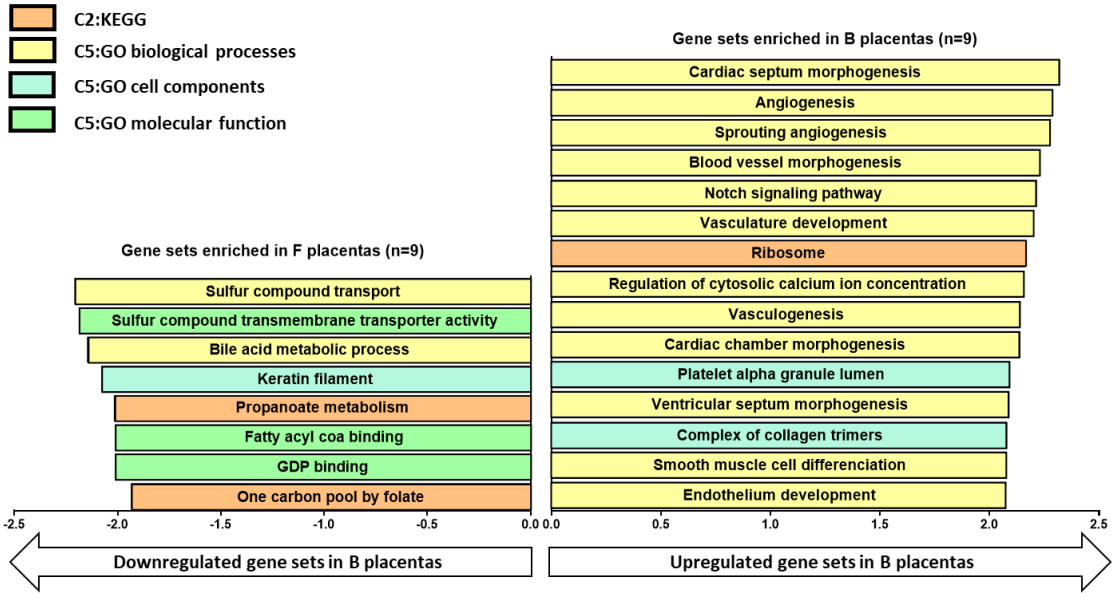


Figure 3: Normalized enrichment scores (NES) of the 15 most differentially regulated pathways identified by Gene Set Enrichment Analysis in the term placenta of mares fed with forage only (F, n=9) or with forage and concentrates (B, n=9) from mid-gestation at a FDR q value<0.05. These results have been obtained from the C2:KEGG (orange), 5:GO biological processes (yellow), C5:GO cell components (blue) and C5:GO molecular function (green) databases.

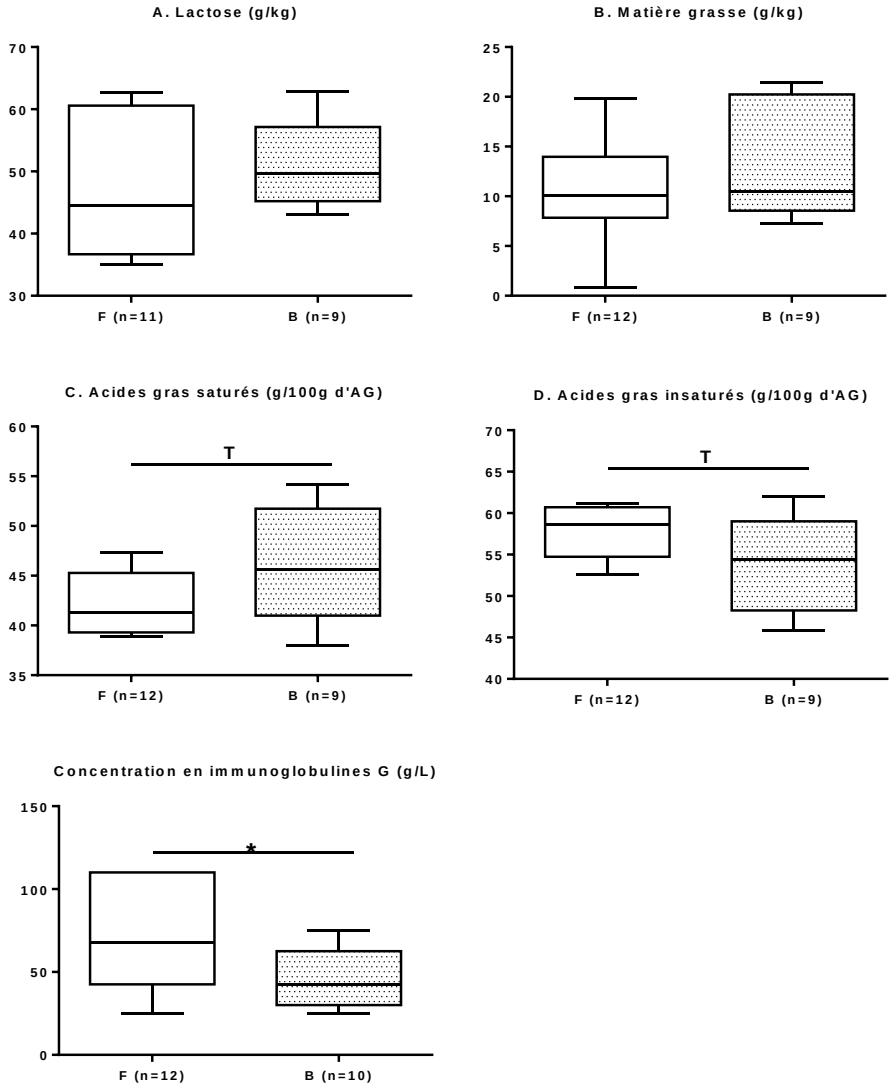


Figure C.1. Qualité du colostrum des juments nourries avec des fourrages uniquement (groupe F) ou avec des concentrés (groupe B) à partir du 7ème mois de gestation

A. Proportion en lactose. B. Proportion en matière grasse. C. Proportion d'acides gras saturés par rapport à la quantité d'acides gras totale. D. Proportion d'acides gras insaturés par rapport à la quantité d'acides gras totale. D. Concentration en immunoglobulines. La lettre « T » correspond à une tendance ($p<0.10$). L'étoile correspond à une différence statistiquement significative ($p<0.05$).

1.3. Résultats complémentaires : Supplémentation en concentrés et qualité du colostrum à la naissance

La qualité du colostrum est essentielle pour assurer un transfert d'immunité passive suffisant vers le poulain après la naissance (Jeffcott, 1974; Perkins et Wagner, 2015). En tant que premier lait, la composition du colostrum est également le reflet de la nutrition et/ou du métabolisme maternel en fin de gestation (Hammer *et al.*, 2011; Coverdale *et al.*, 2015).

La qualité du colostrum a été analysée par la technique de spectrométrie proche infrarouge par Anne Ferlay et ses collaborateurs, dans l'équipe Performance des Animaux et des Troupeaux (PERAQ) de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (Inra de Theix) : lactose, matière grasse, acides gras saturés, acides gras insaturés, acides gras monoinsaturés, acides gras polyinsaturés et acide alpha linolénique (C18 :3ω3). La concentration en immunoglobulines G (IgG) a été mesurée à l'aide d'un Colotest® (refractomètre) (Cash, 1995; Chavatte *et al.*, 1998).

Les données ont été analysées avec le logiciel R (version 3.4.0) en utilisant un modèle linéaire à effet fixe suivi d'une ANOVA de type 3 (package car (Fox et Weisberg, 2011)) prenant en compte le lot de la jument (Concentrés ou Fourrages). L'âge de la jument n'influençait pas la qualité du colostrum, ce facteur n'a donc pas été ajouté dans le modèle. Les résultats sont présentés sous forme de médiane [Q1-Q3] et de box plot (médiane, Q1, Q3, min, max).

Les résultats sont présentés en Figure C.1. A la naissance, les juments qui ont été supplémentées avec de l'orge aplati avaient un colostrum moins riche en IgG que les juments uniquement nourries avec des fourrages (p=0.02). Leur colostrum tendait à avoir une proportion plus importante d'acides gras saturés (p=0.06) et donc moins importante d'acides gras insaturés (p=0.06) en comparaison avec les juments qui n'avaient reçu que des fourrages en fin de gestation.

En terme de concentration en IgG, nos données sont en accord avec deux études publiées par Thorson et al., (2010) et Coverdale et al., (2015) qui observent une diminution de la concentrations en IgG du colostrum, associée avec une diminution de la quantité sérique d'IgG chez les poulains entre 12 et 18h après la naissance (Thorson et al., 2010; Coverdale et al., 2015). De plus, les auteurs n'observent pas de différence de quantité de colostrum produite, ni de pourcentage de matière grasse, de protéines, de concentration d'urée et de nombre de cellules somatiques dans le colostrum des juments des deux groupes. Paramètres que nous n'avons pas évalué. Le colotest® (réfractomètre) permet une mesure semi-quantitative de la concentration du colostrum en IgG, il faudrait donc pour confirmer ces résultats, redoser la quantité d'IgG dans les colostrums par immunodiffusion radiale.

En plus de perturber le métabolisme glucidique des juments gestantes (Coverdale et al., 2015; Peugnet et al., 2015), la supplémentation en céréales, riches en amidon, dans la ration entraine une diminution de la production d'IgG. Ces altérations peuvent ainsi entrainer une diminution de la protection immunitaire passive du poulain aux infections. De plus, une étude réalisée sur deux années consécutives dans un élevage de Trotteurs Français en Basse-Normandie a montré que les poulains qui présentaient des concentrations sanguines d'IgG faibles 48h après la naissance développaient à 6 mois des lésions d'ostéochondrose (Caure and Lebreton, 2004). Ces observations confirment nos résultats : les poulains nés de juments ayant reçu des concentrés en fin de gestation et présentant un colostrum moins riche en IgG étaient plus nombreux à présenter des lésions d'ostéochondrose à 6 mois que les poulains nés de jument ayant ingéré uniquement des fourrages au cours de la gestation (Peugnet et al., 2015).

De plus, la proportion d'acides gras saturés était augmentée dans le colostrum des juments supplémentées avec des céréales. Le rôle du changement des proportions en acides gras saturés et insaturés du colostrum reste à déterminer. Des études de la production laitière des juments menées par Laurence Wimel sont en cours d'analyse et pourront nous renseigner sur la quantité totale de colostrum produit.

En conclusion, distribuer des céréales aux juments en fin de gestation altère la qualité de leur colostrum et augmente la proportion d'acides gras saturés du colostrum. Ces modifications peuvent contribuer à la mise en place du phénotype observé plus tard à l'âge adulte.

2. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle

2.1. Article 3 : Maternal parity affects placental development, growth and metabolism of foals until 1 year and a half

Morgane Robles, Cédric Dubois, Camille Gautier, Michèle Dahirel, Isabelle Guenon, Hélène Bouraima-Lelong, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Catherine Viguié, Pascale Chavatte-Palmer.

Soumis à Theriogenology, en révision.

Cette publication présente l'effet de la primiparité maternelle sur la structure placentaire à terme et le développement des poulains jusqu'à 18 mois.

- La **structure placentaire** à terme a été analysée par stéréologie,
- La **croissance osseuse** a été suivie par mesures de la hauteur au garrot et du périmètre thoracique jusqu'à 18 mois,
- La **maturation testiculaire** des poulains prépubères a été estimée par analyse stéréologique et RT-qPCR,
- Le **métabolisme glucidique** a été estimé par des tests de tolérances intraveineux au glucose (IVGTT).

En conclusion, les juments primipares produisaient des poulains de taille et poids réduits par rapport aux juments multipares. Cette différence était associée à une augmentation des concentrations plasmatiques en triiodothyronine à la naissance chez les poulains nés de juments primipares et à une diminution de la surface d'échange histotrophe placentaire. Les poulains issus de juments primipares sont restés plus petits que les poulains nés de juments multipares jusqu'à au moins 18 mois. Les poulains des juments primipares semblaient avoir un développement retardé du système de régulation de l'homéostasie glucidique jusqu'à 12 mois et les mâles prépubères avaient une maturation testiculaire retardée à 12 mois.

Maternal parity affects placental development, growth and metabolism of foals until 1 year and a half

M Robles[1], C Dubois[2], C Gautier[3], M, Dahirel[1], I Guenon[3], H Bouraima-Lelong[3], C Viguié[4], L Wimel[2], A Couturier-Tarrade[1], P Chavatte-Palmer[1+]

[1]UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France; [2]IFCE, Station Expérimentale, Chamberet, France; [3]Normandie Univ, UNICAEN, EA2608, OeReCa, USC-INRA, Caen, France; [4]INRA, UMR Toxalim, Research Center in Food Toxicology, Toulouse, France

+Corresponding author. Email: pascale.chavatte-palmer@inra.fr

Abstract

Primiparous mares are known to produce smaller foals than multiparous mares. This difference seems to be partly explained by the reduced exchange surface and volume of the placental villi in primiparous compared to multiparous placentas. The effect of maternal parity on foals' post-natal growth, metabolism and sexual maturation, however, has been given little consideration. The objectives of this work were to analyse placental biometry and structure at term, growth of foals and yearlings, their metabolism and testicular maturation at one year of age.

Twenty multiparous mares (M), aged over 6 years and 12 primiparous mares (P), aged up to 5 years were artificially inseminated with the same stallion and monitored the same way until foaling. At birth, foals and placentas were measured and placenta were sampled above at the umbilical cord insertion, as well as in the pregnant and the non-pregnant horn to perform stereological analyses. Foals were weighed and measured until 540 days of age. At 120 and 360 days of age, an Intravenous Glucose Tolerance Test was performed on foals and yearlings. At 360 days of age, the males were castrated and testicular maturation analysed by RT-qPCR.

At birth, P dams produced lighter and smaller foals and placentas. The foal birth weight to placental surface ratio was lower in P compared to M group. P Foals remained lighter than M foals until 360 days of age and smaller until at least 540 days of age. At 120 days of age, P foals had a higher glucose tolerance than M foals, and then may be less mature than M foals to regulate their glucose homeostasis. At 360 days of age, the testicles of prepubertal P stallions were less mature in the P *vs* the M group.

In conclusion, primiparous dams produce intrauterine growth restricted, less mature and smaller foals compared to multiparous dams with altered metabolism and growth until at least 540 days of age. These differences could affect the sport career of these foals, especially if it begins at an early age.

1. Introduction

Studies in human populations and experimental works in non-equine animals have demonstrated that the maternal environment affects the development of the feto-placental unit and can increase the risk of developing non-communicable diseases at adulthood [1–4], and this concept is referred to as the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). In the horse, intra uterine growth restriction (IUGR) experimentally induced by embryo transfer of Saddlebred horses into pony mares was shown to impair feto-placental development and postnatal growth of the offspring until 3 years of age, to alter glucose metabolism until weaning and to increase the risk of developing osteochondrosis lesions at 6 months of age [5–7].

Incidentally, primiparous mares are known to produce lighter and smaller foals at birth compared to multiparous mares [8–16]. These foals remain smaller until one year of age [9,12,14,16]. They have lighter, smaller and less voluminous placentas [10,11,16] with a reduced microscopic area of fetomaternal contact compared to multiparous placentas [10,16]. Thus, Wilsher and Allen, 2003, suggested that the uterus of the mare needs to be 'primed' by a first pregnancy to achieve its full potential [10].

Horses born to primiparous dams seem to perform less in races than horses born to multiparous mares [17] and this difference might be explained by the fact that horses born to primiparous dams are smaller than horses born to multiparous. Indeed, taller horses perform better than smaller horses in race [18,19]. Moreover, it has been shown in the United States that the heaviest and tallest yearlings are sold at better auction prices than smaller yearlings [20].

According to the DOHaD concept, the retardation of growth during *in utero* life might affect more than the size of the foal until weaning [21]. The present study aims to investigate the effects of maternal parity on placental structure at term, growth of foals until 540 days, carbohydrate metabolism of foals until 360 days, testicular maturation and osteochondrosis lesions at 360 days of age.

2. Material and methods

2.1. Animals

2.1.1. Ethical statement

Animal studies were approved by the local animal care and use committee and received ethical approval from the local ethics committee ("Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale du Limousin") under number 5-2013-5.

2.1.2. Management of broodmares and foals

Thirty-two mares (Anglo-Arabian) were used. They were raised in the "Institut Français du Cheval et de l'Equitation" experimental farm (Chamberet, France, 45° 34'55.17''N, 1°43'16.29''E, 442 m). Thirty-two mares were used: 22 multiparous mares (group M, median parity: 3; range 2 to 5, median age: 8; range 6 to 18) and 12 primiparous mares (group P, median age: 4; range 4 to 5). Pregnancies were obtained in all mares by artificial insemination (from May 25th to July 2nd) using semen from one single Anglo-Arabian stallion. Broodmare characteristics are detailed in Table 1.

From insemination, pregnant mares were managed in one same herd in pasture 24h/day with free access to water and mineral salts (Krouner Rumi, CTH, France). From October 28th (median gestational day 146; range 118 to 156), the mares were housed in individual boxes in the same barn. They were fed cracked barley twice a day, hay and haylage and vitamin and minerals supplement (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France) with free access to water until foaling (Supplementary Table 1).

All foals were born in spring (from April 8th to June 6th). Three days after foaling, mares and foals returned in pasture, managed in one same herd, until weaning between October 15th and November 26th (median age: 185; range 172 to 195) by complete, abrupt separation of mares and foals. Foals were then housed in open stalls and fed twice a day with hay and homemade pellets containing barley, oat, soybean cake, bran, molasses and vitamins and minerals with free access to water (Supplementary

Table 2). Six months after weaning, at 360 days of age, all the yearlings returned to pasture 24h/day with free access to water and vitamin and minerals supplement (Supplementary Table 3).

2.1.3. Body measurements

At birth, every 30 days until 180 days and every 90 days until 540 days, foals and yearlings were weighed and withers' height and thoracic perimeter measured.

2.2. Placentas

2.2.1. Placental biometry and sampling

At delivery, the placenta (allantochorion) was weighed. The macroscopic placental surface area was measured by applying a clear Plexiglas sheet marked with 10cmx10cm squares above the placenta [22]. Placentas were laid in the "F" configuration, revealing both uterine horns and the uterine body. Photographs were taken and the placental surface subsequently measured using the ImageJ® software (National Institute of Health). The foal birth weight to placental weight ratio was calculated afterwards. Placental volume was evaluated using a graduated water container, by measuring the volume of water displaced after immersing the placenta into the water.

Placental samples were collected within 30 minutes after delivery from three anatomical regions: one from <10 cm above the umbilical cord insertion, one from the center of the pregnant horn and one from the non-pregnant horn. Three aliquots of each region were then fixed in 4% formaldehyde for histological analysis.

2.2.2. Histological and stereological analyses

Samples were embedded in paraffin. Sections (7µm) were stained with hematoxylin/eosin and scanned using NanoZoomer Digital Pathology® (Hamamatsu Photonics).

Surface densities (Sv) and Volume fractions (Vv) of the different components of the allantochorion, *i.e.*, composing the microcotyledons and the allantois, were quantified by One stop stereology using the Mercator® software (ExploraNova, France, [23]).

As presented in Figure 1, the components measured were:

- **In the microcotyledonary region:** haemotrophic trophoblast, microcotyledonary vessels, connective tissue and microcotyledons as the sum of all microcotyledonary components.
- **In the allantoic region:** histotrophic trophoblast and allantoic vessels. The chorionic mesoderm and allantoic connective tissue were merged as allantoic connective tissue.

Vv and Sv were multiplied by the total volume of the placenta to obtain an estimation of the absolute volume (cm^3) and surface (cm^2) of the components of the allantochorion. Results from the different part of the placenta were pooled to be analysed as one sample representative of the whole organ.

2.3. Endocrinology

Evaluation of glucose metabolism

Intravenous Glucose Tolerance Tests (IVGTT) were performed at median ages 120 and 360 days. The procedure and calculations were previously described [8]. Briefly, foals were muzzled to prevent suckling 6 h before the procedure. They were infused with glucose (0.25 g/kg, 30% glucose IV in one jugular vein) over 2 min. Samples were collected from the other jugular vein into EDTA-coated tubes at -5 min and 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30, 60 and 120 min after the injection started. Blood glucose concentration was immediately analysed using a glucometer (Freestyle optium, Abbott, USA). Plasma was separated after 10 min centrifugation at 5500 rpm and stored in several aliquots at -20˚C until insulin assay. Plasma insulin concentrations were measured using a previously validated human insulin AlphaLISA immunoassay kit (PerkinElmer, USA) [24].

Evaluation of thyroid function

At birth before suckling and at 3, 30, 90 and 180 days of age after 4h fasting at 3 days of age and 6 hours fasting until 180 days of age, jugular vein blood samples were collected in EDTA tubes. Plasma was separated after 10 min centrifugation at 5500 rpm and stored at -20˚C until assay.

Total T3 and total T4 were assayed using MP Biomedicals (Solon, USA) radiommunoassay kits in aliquots of 25 or 10 µl and 50 to 200µl, for T4 and T3, respectively. These assays were validated for horse serum by measuring T3 and T4 in horse plasma spiked with four different concentrations levels: 0, 20, 50 and 100ng/ml and 0, 1, 2.5 and 5ng/ml for T4 and T3, respectively. For T4 assay, mean inter- and intra-assay CVs were 16.0 and 5.7%, respectively and mean exactitude according to expected concentrations in spiked samples was -12.4%. For T3, mean inter- and intra-assay CVs were 9.4 and 13.4%, respectively and mean exactitude according to expected concentrations in spiked samples was -14.5%.

2.4. Testicles

2.4.1. Tissue sampling and treatment

Testicles from prepubertal stallions (group M: n=9 and group P: n=9) aged a median of 324.5 days (range 298-357 days) were collected during routine castration. Castrations were performed in order to have no significant difference in the age of the animals at the time of castration between groups. Testicular samples were snap frozen on dry ice and stored at -80˚C for mRNA extraction.

2.4.2. Quantitative real time PCR

Total mRNA was extracted with Tri-Reagent kit (Sigma-Aldrich, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and PCR reactions were performed as previously described [24]. The relative gene expression was normalized with *GAPDH* RNA expression. The genes analysed were markers of testicular maturity (*Cyp19*, *Connexin 43* (*Cx43*), *Androgen Receptor* (*AR*), *Steroidogenic Acute Regulatory Protein* (*STAR*)), markers of immaturity (*Anti-Müllerian hormone*

(*AMH*)) and genes involved in the establishment of the blood-testis barrier (*Occludin, N Cadherin, β Catenin*). Primer sequences are presented in Table 2.

2.5. Statistical analyses

Results are expressed as median [quartile 1-quartile 3] and presented as boxplots (median and interquartile range (IQR)). Statistical analyses were performed using the R software (http://www.r-project.org, version 3.4.0.).

Data were analysed using a mixed linear model (*nlme* package [25]) followed by a type 3 ANOVA (car package [26]) :

- **Feto-placental biometry**: considering parity of the mare (P or M) and sex of the foal (female or male) as fixed effects. Withers' height of the mare at insemination was considered as random effect. Age of mare could not be included in the statistical model because nearly all primiparous dams were 4 years old (11/12).
- **Stereology results**: considering parity of the mare (P or M) and the placental region (CO, PH or NPH) as fixed effects and the mare as random effect. When results differed between placental regions, a post-hoc Tuckey test was applied using the *lsmeans* package. The interaction between placental region and parity was not statistically significant and then removed from the model.
- **Foal and yearling measurements** were analysed using a mixed quadratic model considering parity of the mare (P or M), the age of the foal (from 30 days of age) and the interaction parity:age of the foal as fixed effects and the foal as random effect. When parity:age interaction was statistically significant, a post-hoc Tuckey test was applied using the *lsmeans* package [27].
- **Thyroid hormone results** were analysed using a mixed linear model considering the parity of the mare (P or M), the age of the foal and the interaction parity:age of the foal as fixed effect.

The foal itself was considered as random effect. When parity:age interaction was statistically significant, a post-hoc Tuckey test was applied using the *lsmeans* package.

Metabolic tests results were analysed with a fixed linear model followed by a type 3 ANOVA considering parity of the mare (P or M).

Sex of the foal was removed from the models for foal and yearling measurement metabolic tests and thyroid endocrinology as it had no effect on these parameters. Weight of mares at insemination and parturition had no statistically significant effect on the different parameters measured and was then not included in the models.

Testicular data were analysed using a principal component analysis (PCA) of the FactoMineR package [28].

Effects were considered significant when $p<0.05$.

3. Results

3.1. Feto-placental biometry and placental structure at birth

3.1.1. Feto-placental biometry

Statistically significative results are presented in Figure 2.

Gestation length was reduced by 8 days in P compared with M mares.

At birth, P foals were lighter (-8.3kg, $p<0.001$), smaller (-5cm, $p<0.01$) and had a reduced thoracic perimeter ($p<0.010$) than M foals. P placentas were lighter (-510g, $p<0.01$) and less voluminous (-585.6cm², $p<0.01$). Moreover, the foal birth weight to placental surface ratio was reduced in P compared to M groups (-0.24g/cm², $p<0.01$). P placentas tended to have a lower placental surface area than M placentas (-4.75cm, $p=0.087$). There was no effect of maternal parity on placental efficiency.

Gestation length was reduced by 2 days in mares carrying females comparing with males ($p=0.046$). Sex of foal had no effect on other parameters measured.

3.1.2. Placental structure

Stereological results are presented in Table 3.

- **In the microcotyledonary region**: P placentas had a reduced volume and surface of microcotyledonary connective tissue (-30.0cm3, -18.2%, p=0.03; -0.62.10^5cm², -27.7%, p=0.01, respectively) compared to M placentas.

  Placenta of females had a lower volume of microcotyledonary connective tissue (-6.31cm^3, -4.1%, p<0.001) and a lower volume of microcotyledons (-46.1cm^3, -5.5%, p=0.02) compared to placental of males.
- **In the allantoic region**: P placentas had a reduced volume of allantoic connective tissue (-602.8cm^3, -35.7%, p<0.001), had a reduced surface of histotrophic trophoblast (-0.13.10^5cm², -18.8%, p=0.04) and of allantoic vessels (-0.21.10^5cm², -27.8%, p<0.01).

3.2. Foal and yearling growth

Measurements of foals and yearlings are presented in Figure 4.

P foals and yearlings were lighter than M foals and yearlings until 360 days of age (p<0.01). Moreover, P foals were smaller with a reduced thoracic perimeter compared to M foals until 540 days of age (p<0.0001, p<0.0001, respectively).

3.3. Glucose metabolism

Results of metabolic tests are presented in Figure 5.

At 120 days of age, P foals had a lower area under curve of glucose compared to M foals (p=0.02). There was no difference of maximum of glucose concentration, area under curve of insulin and maximum of insulin concentration between groups. There was no difference of fasted concentrations of glucose and insulin.

At 360 days of age, P foals tended to have a lower area under curve of glucose compared to M foals (p=0.09). There was no difference of maximum of glucose concentration, area under curve of insulin

and maximum of insulin concentration between groups. There was no difference of fasted concentrations of glucose and insulin.

3.4. Thyroid endocrinology

Maternal parity did not affect plasma T3 and T4 concentrations until weaning. However, both concentrations decreased with age until 30 days of age ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectively). Moreover, for T3 plasma concentration, the interaction parity:age was statistically significant ($p=0.04$), with P foals having a higher plasma concentration of T3 at birth compared to M foals ($p<0.01$).

3.5. Testicular maturation

Principal component analysis of testicular maturation is shown in Figure 6.

The 2nd dimension (22.69% of variance) separated P from M prepubertal stallions (F test, $p=0.03$), associated with a decreased expression of *Cyp 19* ($p<0.001$) and *AR* ($p<0.0001$) and an increased expression of *β Catenin* ($p<0.0001$) in P compared with M yearlings.

4. Discussion

In the present study, primiparous dams produced lighter and smaller foals and placenta at term compared to multiparous dams. Placentas of primiparous had a decreased surface of allantoic components compared to placentas of multiparous mares. The foal birth weight to placental ratio was reduced in primiparous compared to multiparous group. Foals born to primiparous mares were lighter until 360 days of age and smaller until 540 days of age compared to foals born to multiparous mares. At 120 days of age, foals born to primiparous dams had a higher glucose tolerance than foals born to multiparous dams and tended to have a higher glucose tolerance at 360 days of age. At 360 days of age, prepubertal stallions born to primiparous dams had less mature testicles compared to prepubertal stallions born to multiparous dams.

As observed previously in other breeds (Thoroughbred, Brazilian Sport Horse, Mangalarga Paulista and Quarter Horse), foals born to primiparous dams were lighter and smaller at birth compared with foals born to multiparous dams [10–12,15,16]. In humans, intra uterine growth retardation (IUGR) is defined as a birth weight below the tenth percentile for gestational age [35]. Here, the weight of P foals was 3.1kg below the 10^{th} percentile of M foals' birth weight. Moreover, the weight of P foals was 3.1kg below the 10^{th} percentile of 89 foals of the same breed born between 2011 and 2015 in the same farm. Then, in the light of this definition, P foals can be considered as IUGR. However, we will consider them as hypotrophic because we do not have the median weight of a much bigger population of Anglo-Arabian horses.

In the present study, the gestation length of primiparous dams was shorter than the gestation length of multiparous dams. This could have explained the difference of birthweight of foals. Nevertheless, when we calculate the theoretical *in utero* growth of foetuses using the equation from the National Research Council (NRC, [29]) we observe that there should have been a difference of 4.3 kg between both groups of foals (P foals should have weighed 48.7kg at birth instead of 44.3kg if they had the same in utero growth than M foals but were born 8 days earlier). Moreover, in other studies, there was either no difference of gestation length depending on parity of the mare or primiparous dams had longer gestation length than multiparous dams [9,16,30,31]. In fact, the gestation length has been shown to be influenced by numerous factors such as foal sex, month of birth, year of breeding (climate, photoperiod), age, genetics, breed and nutritional state [30–34]. To conclude, the decreased birth weight of foals born to primiparous dams seem to be unlikely linked with gestation length.

We also confirm that primiparous mares produced lighter placentas than multiparous mares [10–12,16]. However, as defined by Wilsher and Allen, 2003, the foal birth weight to placental surface can be an index to estimate the placental efficiency [10]. Then primiparous dams had a lower placental efficiency compared to multiparous dams while other authors observed the contrary between primiparous dams and young (5 to 9 years) multiparous dams [10,16]. Here, all the primiparous dams

were 4 to 5 years old while the multiparous dams had more than 6 years of age. It has been observed previously that young mares (5 to 9 years of age) had a less efficient placenta than older mares [10]. Then, the difference in age between primiparous and multiparous mares in this study may explain these different observations.

It has been observed previously that placentas of primiparous mares had less surface and volume of villi (microcotyledons) than placentas of multiparous mares only in the placental body or than whole placentas of young multiparous mares (5 to 9 years) only [10,16]. In the present study, we observed a difference only in connective tissue of microcotyledons, that may be explained by the age of mares as fibrosis become more important with age and particularly number of foalings [16]. In the present study, we observed that P placentas had a lower surface of the allantoic components (histotrophic trophoblast, vessels and connective tissue) compared to M placentas. Moreover, when comparing the surface and volume of microcotyledons between young multiparous mares (aged 5-9 years) and primiparous mares we did not observe any statistically significant difference.

It has been observed that the diameter of the uterine arteries was severely decreased in primiparous compared to multiparous mares [13]. These observations may be linked with the decreased vascularisation of the allantoic observed in the placentas of P mares.

The histotrophic trophoblast, located within the areolae, is involved in the exchange of nutrients that are produced by the uterine gland [36]. Moreover, this tissue has been shown to not have precisely the same function than the haemotrophic trophoblast: for example, it expresses calcium transporter while the haemotrophic trophoblast do not [37]. Therefore, it seems that the histotrophic nutrition in primiparous mares, that has not been explored previously, may be more severely affected than the haemotrophic nutrition in primiparous mares, possibly because of a difference of the endometrial glands function as it has been proposed by Wilsher and Allen, (2003) [10].

These differences, that were observed within all the placental regions, may help to explain the decreased placental efficiency between primiparous and multiparous mares as well as the smaller and lighter placentas and foals at birth.

P foals were smaller than M foals until at least 540 days of age. It has been shown previously that this difference is observed until 360 days of age in various breeds [9,12,16] and had disappeared in the Brazilian Sport Horse and the Mangalarga Paulista at 2 years of age [16]. These results are of importance for the equine industry as horses for the races are sold at auction at around one year of age and begin their career early, around two years of age. It has been shown that taller horses are sold at auction with a better price than smaller horses and that the horse's height might be linked with its race performances [18–20].

To our knowledge, the glucose metabolism of foals and yearlings born to primiparous or multiparous dams has not been investigated. At 120 days of life, there was no difference of insulin secretion between both groups of foals but P foals had an accelerated glucose clearance rate. According to George et al., (2009), insulin sensitivity decreases with age of foals and immature foals may present a higher insulin sensitivity until at least 160 days of age [38]. Here, P foals are more insulin sensitive and may be less mature than M foals until at least 120 days of age. Moreover, it has been shown that dysmature foals, piglets and lambs were more insulin sensitive in early life but that insulin sensitivity decreased at adulthood [6,39–44]. The difference of insulin sensitivity observed at 120 days of age remained only as a tendency at 360 days of age, following the same trend as other IUGR individuals. In addition to the difference of height, this difference of glucose metabolism may affect the short-term (race) or long-term (sport) performance of horses.

Thyroid hormones are involved in bone growth, energy metabolism and thermoregulation. As observed earlier, thyroid hormones concentration are elevated at birth and decrease with age [6,45–48].

An elevated T3 concentration in the days following birth has been linked with dysmaturity and IUGR in horses [6]. The increased T3 plasma concentration observed in P foals may then be associated with a slowed-down maturity of these foals, that may be linked with the decreased histotrophic nutrition capacity and vascularisation of the placenta. Moreover, catch-up growth in foals born dysmature has

been linked with an increased T3 plasma concentration [6]. As P foals did not catch-up the weight of M foals before 450 days of age, we did not expect a difference in T3 plasma concentration until at least 360 days of age.

To our knowledge, the testicular maturation of prepubertal stallions born to primiparous or multiparous dams has not been investigated. Puberty in stallions lasts around 1 year, from around 360 days of age to 2 years of age [49,50]. In a previous study, we observed in testicles of prepubertal stallions of the same age and the same breed that the expression of *Cyp19* and *AR* (sensibility to androgens increases with testicular maturation [51]) was correlated with the higher levels of maturity (opened tubules) observed using the stereology method while the expression of *N Cadherin*, *Occludin* and *β Catenin* was associated with the lower level of maturity (tubules without a lumen) [24]. Here, maternal multiparity was associated with an increased expression of *Cyp19* and *AR* while maternal primiparity was associated with an increased expression of *β-catenin*. We can then conclude P colts had less mature testicles than M colts. It has been shown that IGF-1 stimulates the Sertoli cell proliferation in mice [52]. Moreover, foals born to primiparous dams have a decreased IGF-1 serum concentration compared to foals born to multiparous dams until at least 4 months of age [14]. This decrease in IGF-1 concentration may then be linked with the retarded testicle maturity of P foals. Finally, in pigs and rats, IUGR has been linked with delayed puberty and testicular development, and long-term altered testicular function [53,54].

5. Conclusion

In conclusion, primiparous mares produced hypotrophic foals that had signs of delayed maturity such as decreased concentration of triiodothyronine. These differences at birth were associated with a decreased foal birth weight to placental surface ratio and histotrophic nutrition capacity in placentas of primiparous mares. Foals born to primiparous mares were smaller until at least 540 days of age, and had a delayed testicular maturation and possibly a delayed maturation of the glucose homeostasis regulation system.

These alterations of long-term development may affect the selling price and the short- and long-term sport performance of horses.

6. Bibliography

[1] Barker D. The origins of the developmental origins theory. J. Intern. Med., vol. 261, 2007, p. 412–7. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.

[2] Hanson M, Gluckman P. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev 2014;94:1027–76. doi:10.1152/physrev.00029.2013.

[3] Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Kiefer H, Duranthon V, Jammes H. Breeding animals for quality products: not only genetics. Reprod Fertil Dev 2016;28:94–111. doi:10.1071/RD15353.

[4] McMullen S, Mostyn A. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. Proc Nutr Soc 2009;68:306–20. doi:10.1017/S0029665109001396.

[5] Allen W, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale P, et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. Reproduction 2002;172:237–46.

[6] Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Pre-Weaning Horses. PLoS One 2014;9:e102044. doi:10.1371/journal.pone.0102044.

[7] Peugnet P, Mendoza L, Wimel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, et al. Longitudinal Study of Growth and Osteoarticular Status in Foals Born to Between-Breed Embryo Transfers. J Equine Vet Sci 2016;37:24–38. doi:10.1016/j.jevs.2015.11.008.

[8] Doreau M, Boulot S, Martin-Rosset W. Effect of parity and physiological state on intake, milk production and blood parameters in lactating mares differing in body size. Anim Prod 1991;53:111–8. doi:10.1017/S0003356100006048.

[9] Pool-Anderson L, Raub R, Warren J. Maternal Influences on Growth and Development of Full-Sibling Foals. J Anim Sci 1994;72:1661–6.

[10] Wilsher S, Allen W. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. Equine Vet J 2003;35:476–83. doi:10.2746/042516403775600550.

[11] Elliott C, Morton J, Chopin J. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. Theriogenology 2009;71:683–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.041.

[12] Fernandes C, Meirelles M, Guimaraes C, Nichi M, Affonso F, Fonte J, et al. Which paternal, maternal and placental parameters influence foal size and vitality? J Equine Vet Sci 2014;34:225–7. doi:10.1016/j.jevs.2013.10.161.

[13] Klewitz J, Struebing C, Rohn K, Goergens A, Martinsson G, Orgies F, et al. Effects of age, parity, and pregnancy abnormalities on foal birth weight and uterine blood flow in the mare. Theriogenology 2015;83:721–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.007.

[14] Cymbaluk N, Laarveld B. The ontogeny of serum insulin-like growth factor-I concentration in foals: effects of dam parity, diet, and age at weaning. Domest Anim Endocrinol 1996;13:197–209. doi:0739724096000148 [pii].

[15] Lawrence L, DiPietro J, Ewert K, Parrett D, Moser L, Powell D. Changes in body weight and condition of gestating mares. J Equine Vet Sci 1992;12:355–8. doi:10.1016/S0737-0806(06)81361-4.

[16] Meirelles MG, Veras MM, Alonso MA, de Fátima Guimarães C, Nichi M, Fernandes CB. Influence of maternal age and parity on placental structure and foal characteristics from birth

up to two years of age. J Equine Vet Sci 2017. doi:10.1016/j.jevs.2017.03.226.

[17] Barron J. The effect of maternal age and parity on the racing performance of Thoroughbred horses. Equine Vet J 1995;27:73–5. doi:10.1111/j.2042-3306.1995.tb03036.x.

[18] Dolvik N, Klemetsdal G. Conformational traits of Norwegian cold-blooded trotters: Heritability and the relationship with performance. Acta Agric Scand - Sect A Anim Sci 1999;49:156–62. doi:10.1080/090647099424060.

[19] Smith A, Staniar W, Splan R. Associations between yearling body measurements and career racing performance in Thoroughbred racehorses. J Equine Vet Sci 2006;26:212–4. doi:10.1016/j.jevs.2006.03.002.

[20] Pagan JD, Koch A, Caddel S, Nash D. Size of Thoroughbred yearlings presented for auction at Keeneland sales affects selling prince. 19th Equine Sci. Soc. Symp., vol. 19, 2005, p. 224–é25.

[21] Peugnet P, Robles M, Wimel L, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. Theriogenology 2016;86:99–109. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.028.

[22] Allen W, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale P, et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. Reproduction 2002;172:445–53.

[23] Reed M, Howard C, DE Yanés G. One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers. J Microsc 2010;239:54–65. doi:10.1111/j.1365-2818.2009.03356.x.

[24] Robles M, Gautier C, Mendoza L, Peugnet P, Dubois C, Dahirel M, et al. Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years. PLoS One 2017;12:e0169295. doi:10.1371/journal.pone.0169295.

[25] Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Core Team R. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Packag Version 21-131 2017.

[26] Fox J, Weisberg S. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Sage; 2011.

[27] Lenth R V. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. J Stat Softw 2016;69:1–33. doi:10.18637/jss.v069.i01.

[28] Lê S, Josse J, Husson F. **FactoMineR** : An *R* Package for Multivariate Analysis. J Stat Softw 2008;25:1–18. doi:10.18637/jss.v025.i01.

[29] NRC. Nutrient Requirements of Horses - Sixth revised edition. Washington, D.C.: National Academies Press; 2007. doi:10.17226/11653.

[30] Satué K, Felipe M, Mota J, Muñoz A. Gestational length in Carthusian broodmares: effects of breeding season, foal gender, age of mare, year of parturition, parity and sire. Pol J Vet Sci 2011;14:173–80. doi:10.2478/v10181-011-0027-6.

[31] Aoki T, Yamakawa K, Ishii M. Factors affecting gestation length in heavy draft mares. J Equine Vet Sci 2013;33:437–40. doi:10.1016/j.jevs.2012.07.011.

[32] Valera M, Blesa F, Santos R Dos, Molina A. Genetic study of gestation length in andalusian and arabian mares. Anim Reprod Sci 2006;95:75–96. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.09.008.

[33] Morel M, Newcombe J, Holland S. Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. Anim Reprod Sci 2002;74:175–85. doi:10.4141/cjas79-010.

[34] Satué K, Felipe M, Mota J, Muñoz A. Factors influencing gestational length in mares: A review. Livest Sci 2011;136:287–94. doi:10.1016/j.livsci.2010.09.011.

[35] The World Health Report 1995: bridging the gaps. Geneva: WHO; 1995.

[36] Allen W. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. Reproduction

2001;121:513–27.

[37] Wooding F, Morgan G, Fowden A, Allen W. Separate Sites and Mechanisms for Placental Transport of Calcium, Iron and Glucose in the Equine Placenta. Placenta 2000;21:635–45. doi:10.1053/plac.2000.0550.

[38] George L, Staniar W, Treiber K, Harris P, Geor R. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. Domest Anim Endocrinol 2009;37:23–9. doi:10.1016/j.domaniend.2009.01.003.

[39] Camacho LE, Chen X, Hay WW, Limesand SW. Enhanced insulin secretion and insulin sensitivity in young lambs with placental insufficiency-induced intrauterine growth restriction. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol 2017.

[40] Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer Into Smaller or Larger Breeds Alters Postnatal Growth and Metabolism in Weaned Horses. J Equine Vet Sci 2015. doi:10.1016/j.jevs.2016.03.016.

[41] Poore K, Fowden A. The effect of birth weight on glucose tolerance in pigs at 3 and 12 months of age. Diabetologia 2002;45:1247–54. doi:10.1007/s00125-002-0849-y.

[42] De Blasio MJ, Gatford KL, Robinson JS, Owens JA. Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007;292:R875–86. doi:10.1152/ajpregu.00430.2006.

[43] Owens JA, Thavaneswaran P, De Blasio MJ, McMillen IC, Robinson JS, Gatford KL. Sex-specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep. Am J Physiol Metab 2007;292:E1879–89. doi:10.1152/ajpendo.00706.2006.

[44] Gatford KL, Mohammad SNB, Harland ML, De Blasio MJ, Fowden AL, Robinson JS, et al.

Impaired β-cell function and inadequate compensatory increases in ??-cell mass after intrauterine growth restriction in sheep. Endocrinology 2008;149:5118–27. doi:10.1210/en.2008-0233.

[45] Irvine CH, Evans MJ. Postnatal changes in total and free thyroxine and triiodothyronine in foal serum. J Reprod Fertil Suppl 1975:709–15.

[46] Malinowski K, Christensen R, Hafs H, Scanes C. Age and breed differences in thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins in female horses. J Anim Sci 1996;74:1936. doi:10.2527/1996.7481936x.

[47] Murray M, Luba N. Plasma gastrin and somatostatin, and serum thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), reverse triiodothyronine (rT3) and cortisol concentrations in foals from birth to 28 days of age. Equine Vet J 1993;25:237–9. doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb02951.x.

[48] Furr M, Murray M, Ferguson D. The effects of stress on gastric ulceration, T3, T4, reverse T3 and Cortisol in neonatal foals. Equine Vet J 1992;24:37–40. doi:10.1111/j.2042-3306.1992.tb02776.x.

[49] Clemmons A, Thompson D, Johnson L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. Biol Reprod 1995;52:1258–67. doi:10.1095/biolreprod52.6.1258.

[50] Johnson L. Efficiency of spermatogenesis. Microsc Res Tech 1995;32:385–422. doi:10.1002/jemt.1070320504.

[51] Almeida J, Conley A, Mathewson L, Ball B. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. Reproduction 2011;141:841–8. doi:10.1530/REP-10-0499.

[52] Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou M, Aubry F, et al. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. Mol Endocrinol 2013;27:814–27. doi:10.1210/me.2012-1258.

[53] Lin Y, Cheng X, Sutovsky P, Wu D, Che LQ, Fang ZF, et al. Effect of intra-uterine growth restriction on long-term fertility in boars. Reprod Fertil Dev 2017;29:374–82. doi:10.1071/RD15130.

[54] van Weissenbruch MM, Engelbregt MJT, Veening MA, Delemarre-van de Waal HA. Fetal nutrition and timing of puberty. Endocr Dev 2005;8:15–33. doi:10.1159/000084084.

Table 1. Maternal age, parity, withers' height, weight at insemination and weight at parturition (median [quartile 1-quartile 3]) and % of male and female foals within groups of multiparous and primiparous mares.

Group	Age (years)	Parity	Withers' height (cm)	Weight at insemination (kg)	Weight at parturition (kg)	% males	% females
Multiparous (n=20)	8.0 [7.1-9.2]	2.0 [1.0-2.25]	161 [160-164]	597.5 [572.6-626.4]	649.5 [622.5-667.5]	45	55
Primiparous (n=12)	4.1 [4-4.1]	0.0 [0.0-0.0]	159 [153-164]	523.9 [478.9-550.7]	612.2 [550.0-631.5]	75	25

Table 2. Primers sequences used for amplification of equine products in RT-qPCR assays in testicles of prepubertal colts.

Gene	GenBank accession number	Primer	Size of PCR product (pb)
AMH	JF330269,1	Forward: 5' - CCATCTGGAGGAGCCAAC - 3' Reverse: 3' - CCCGTGACAGTGACCTCAG - 5'	80
Androgen Receptor	NM_001163891,1	Forward: 5' - AGTACTCCTGGATGGGGCTT - 3' Reverse: 3' - TGTACATCCGGGACTTGTGC - 5'	132
B Catenine	NM_001122762,1	Forward: 5' -ACAATGGCTACTCAAGCCGA- 3' Reverse: 3' - CCAGTGACTAACAGCCGCTT- 5'	78
Connexin 43	XM_005596901,1	Forward: 5' - CTCTTCACCAACCGCTCCT - 3' Reverse: 3' - CTGTCTCCGGTAACCAGCTT - 5'	68
Cyp 19	NM_001081805,1	Forward: 5' -AAAGCCACCCGGTTCCTAAC- 3' Reverse: 3' -CCTTGATCTCAGGCGAAGCA- 5'	119
GAPDH	AF157626	Forward: 5' -CCAGAACATCATCCCTGCTT - 3' Reverse: 3' -CGTATTTGGCAGCTTTCTCC- 5'	158
N Cadherine	XM_001495782,3	Forward: 5' -GCCATTCAGACTGACCCGAA- 3' Reverse: 3' - CTGCAGCGACAGTAAGGACA- 5'	100
Occludin	XM_001504044,3	Forward: 5' -AAGCTTCCATGTCAGTGCCTT- 3' Reverse: 3' -TTGCTTGGTGCGTAATGATTGG - 5'	84
STAR	NM_001081800,1	Forward: 5' - TGGCCTATATCCAGCAGGGA- 3' Reverse: 3' -AATACCTTGCCCACGTCTGG- 5'	142

Table 3. Volume and surface of the different components of the placenta measured using the stereology method in term placentas of primiparous (n=11) or multiparous (n=17) mares.

	Primiparous (n=11)	Multiparous (n=17)	P value
Volume (cm^3)			
Microcotyledonary region			
Haemotrophic trophoblast	424.5 [302.7-561.2]	347.1 [259.4-508.4]	NS
Vessels	272.1 [192.9-501.5]	307.7 [209.3-373.8]	NS
Connective tissue	**134.7 [86.2-159.5]**	**164.7 [138.7-220.5]**	**0.03**
Microcotyledon	855.0 [555.2-1265.1]	830.0 [685.0-1020.6]	NS
Allantoic region			
Histotrophic trophoblast	134.5 [106.1-158.5]	116.6 [101.3-159.0]	NS
Vessels	343.5 [233.6-540.8]	353.2 [263.9-468.7]	NS
Connective tissue	**1084.2 [1043.1-1364.8]**	**1687.0 [1492.3-1924.1]**	**<0.001**
Surface (10^5 cm^2)			
Microcotyledonary region			
Haemotrophic trophoblast	4.35 [3.45-8.41]	5.62 [5.00-7.02]	NS
Vessels	2.75 [2.35-5.35]	4.36 [3.75-5.18]	NS
Connective tissue	**1.62 [1.10-2.02]**	**2.25 [1.73-2.73]**	**0.01**
Microcotyledon	8.73 [6.77-15.98]	12.69 [11.00-14.01]	NS
Allantoic region			
Histotrophic trophoblast	**0.55 [0.44-0.65]**	**0.68 [0.59-0.94]**	**0.04**
Vessels	**0.54 [0.39-0.63]**	**0.75 [0.63-1.35]**	**<0.01**
Connective tissue	1.08 [0.95-1.73]	1.58 [1.36-2.18]	NS

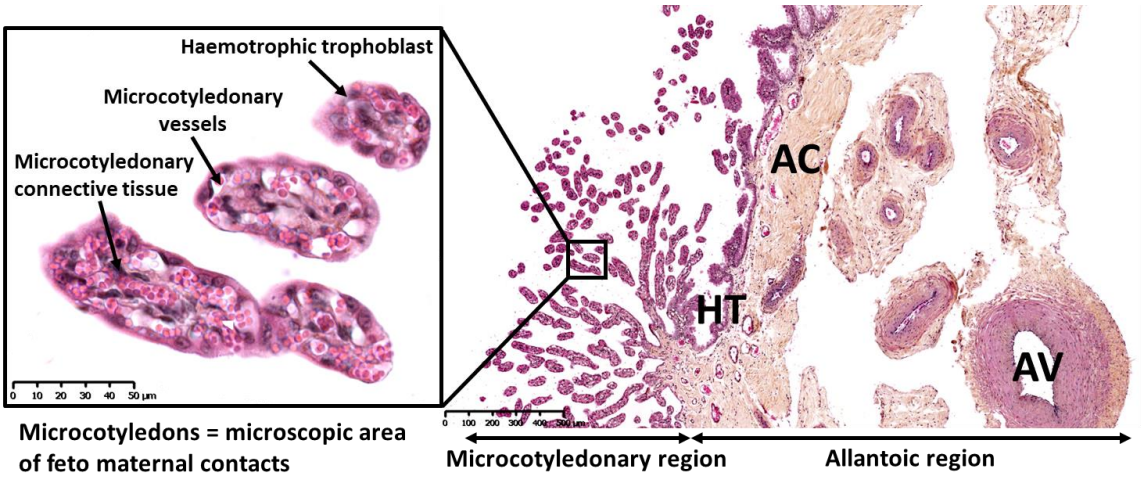


Figure 1: Structure of the horse placenta at term and placental components measured by stereology. AC: Allantoic connective tissue, AV: Allantoic vessel, HT : Histotrophic trophoblast.

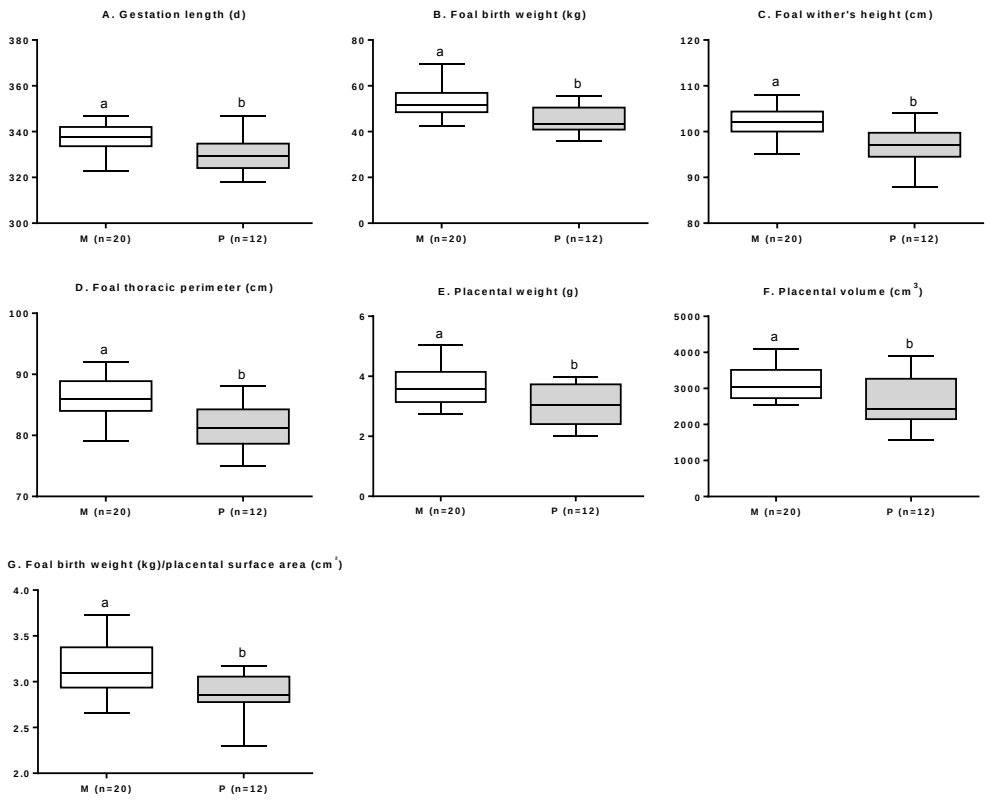


Figure 2: Gestation length and feto-placental biometry at birth between foals born to multiparous (n=20) and primiparous (n=12) mares. A. Gestation length. B. Foal birth weight. C. Foal wither's height. D. Foal thoracic perimeter. E. Placental weight. F. Placental volume. G. Foal birth weight/placental surface area ratio. Different letters correspond to statistically different results ($p<0.05$), the use of the same letter corresponds to statistically non-different results ($p>0.05$).

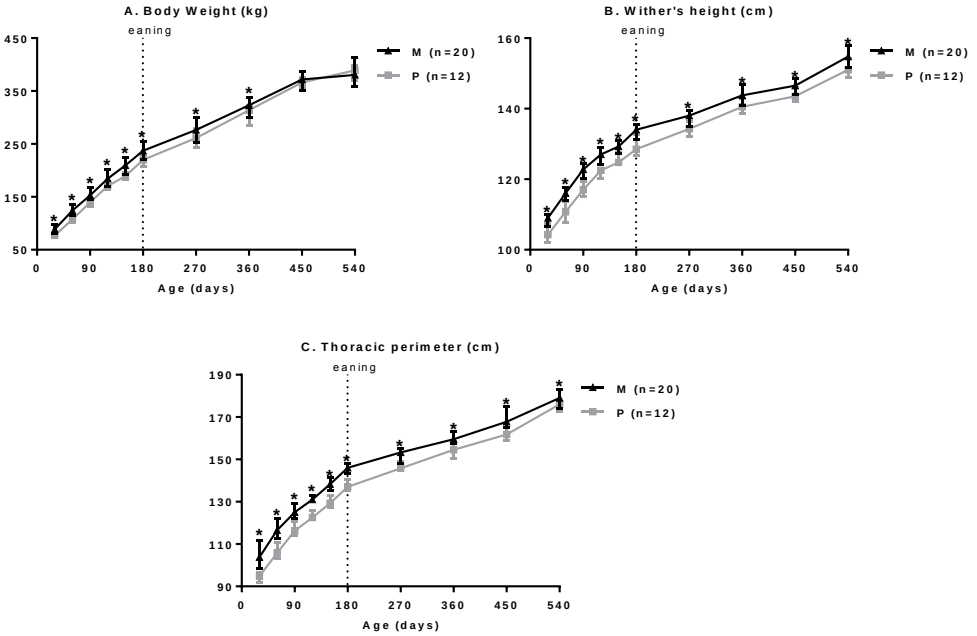


Figure 4: Growth of foals and yearlings born to multiparous (n=20) or primiparous (n=12) dams until 1.5 years of age. A. Body weight. B. Wither's height. C. Thoracic perimeter. Values marked with an asterisk are significantly different ($p<0.05$).

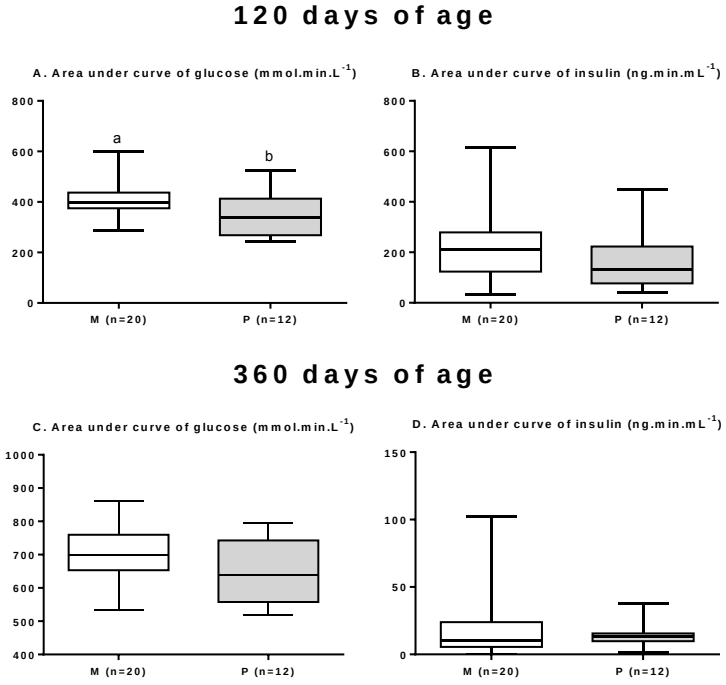


Figure 5: Intravenous glucose tolerance test result of foals and yearlings born to multiparous (n=20) or primiparous (n=12) dams at 120 and 360 days of age. A. Area under the curve of glucose at 120 days of age. B. Area under the curve of insulin at 12 days of age. C. Area under the curve of glucose at 360 days of age. D. Area under the curve of insulin at 360 days of age.

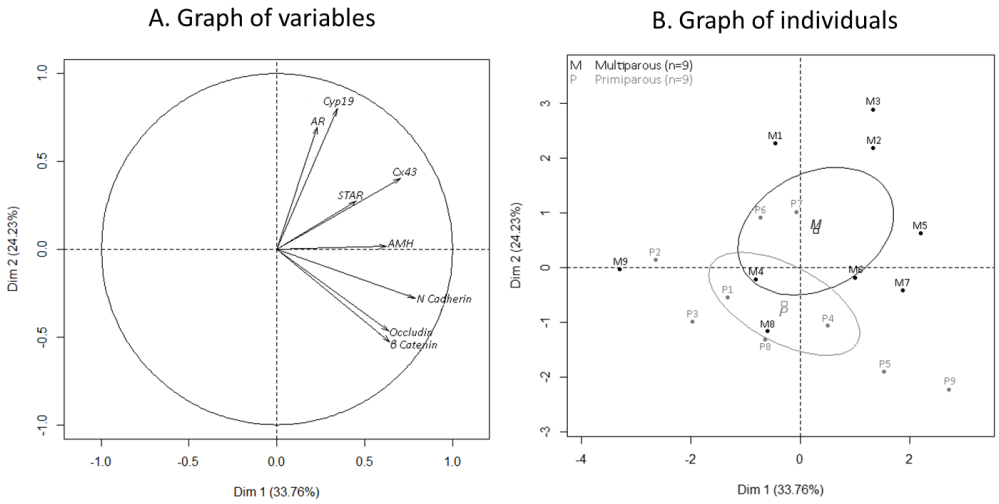


Figure 6: Principal component analysis of expression of genes involved in testicular maturity (*Cyp19*, *Connexin 43* (*Cx43*), *Androgen Receptor* (*AR*), *Steroidogenic Acute Regulatory Protein* (*STAR*)), testicular immaturity (*Anti-Müllerian hormone* (*AMH*)) and genes involved in the establishment of the blood-testis barrier (*Occludin, ß catenin and N Cadherin*) . A. Graph of variables. The expression of *Cyp19* ($p<0.0001$) and *AR* ($p<0.0001$) is positively correlated with the 2nd dimension while the expression of *ß-catenin* ($p<0.0001$) is negatively correlated with the 2nd dimension. B. Graph of individuals. Despite the fact that ellipses overlap, there is a statistically significant difference between M and P testicles, separated by the 2nd dimension ($p=0.045$).

Supplementary Table 1. Nutritional information of pregnant mares. A. Daily nutritional supply ingested by pregnant mares during wintering (from 6 months of gestation to foaling) (median and [Q1-Q3]). B. Quality of feedstuff from the INRA system given to pregnant mares during wintering (from 6 months of gestation to foaling). HFU: Horse feed unit (net energy, 1 HFU = 2250 kcal), HDCP : Horse digestible crude protein, RC: Raw cellulose.

A	**Hay (kg of dry matter)**						
Month of gestation	170	174	192	263	284	322	348
Multiparous (n=20)	8.3 [8.3-8.3]	5.5 [5.5-5.5]	5.5 [5.5-5.5]	5.5 [5.5-6.0]	6.0 [5.5-6.0]	6.0 [5.5-6.0]	6.0 [5.5-6.0]
Primiparous (n=12)	8.3 [8.3-8.3]	5.5 [5.5-5.5]	5.5 [5.5-5.5]	5.5 [5.5-6.0]	5.5 [5.5-6.0]	5.5 [5.5-6.0]	5.5 [5.5-6.0]
	Haylage (kg of dry matter)						
Month of gestation	170	174	192	263	284	322	348
Multiparous (n=20)	0.7 [0.7-0.7]	2.9 [2.9-2.9]	2.9 [2.9-2.9]	3.7 [2.9-3.7]	3.7 [2.9-4.1]	3.7 [2.9-4.1]	3.7 [2.9-4.1]
Primiparous (n=12)	0.7 [0.7-0.7]	2.9 [2.9-2.9]	2.9 [2.9-2.9]	2.9 [2.9-3.7]	3.3 [2.9-4.1]	3.3 [2.9-4.1]	3.3 [2.9-4.1]
	Concentrate (kg of dry matter)						
Month of gestation	170	174	192	263	284	322	348
Multiparous (n=20)	1.3 [1.3-1.3]	1.3 [1.3-1.3]	1.3 [1.3-1.3]	1.8 [1.3-2.7]	1.8 [1.3-2.7]	1.8 [1.3-2.7]	2.7 [2.2-2.6]
Primiparous (n=12)	1.3 [1.3-1.3]	1.3 [1.3-1.3]	1.3 [1.3-1.3]	1.3 [0.9-2.7]	1.8 [0.9-3.1]	1.8 [0.9-3.1]	2.7 [1.8-4]

B	**Hay 1 (used until the 25th of April)**			**Hay 2 (used from the 26th of April until foaling)**			**Haylage**			**Concentrate**		
	HFU	HDCP (g)	RC (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)
	0.6	30.0	343.9	0.6	33.0	352.3	0.7	39.0	282.7	1.06	221.0	47.1

Supplementary Table 2. Nutritional information of growing foals. A. Daily nutritional supply ingested by growing foals during wintering (from 6 to 12 months of age) (median and [Q1-Q3]). B. Quality of feedstuff from the INRA system given to pregnant mares during wintering (from 6 to 12 months of age). HFU: Horse feed unit (net energy, 1 HFU = 2250 kcal), HDCP : Horse digestible crude protein, RC: Raw cellulose.

A	**Hay (kg of dry matter)**	**Concentrate (kg of dry matter)**
Until 10 months of age	4.6	2.2
From 10 until 12 months of age	4.6	2.7

B	**Hay**			**Concentrate**		
	HFU	HDCP (g)	RC (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)
	0.6	33.0	352.3	1.1	102	63.9

Supplementary Table 3. Composition of the vitamin and minerals complement given to foals and yearlings in pasture.

Composition	Calcium carbonate, monocalcium phosphate, magnesium oxide, lithothamne, cane molasses, sodium chloride, magnesium phosphate, plants
Vitamins / kg of brute matter	
Vitamin A	300 000 IU
Vitamin D3	90 000 IU
Vitamin E	1000 IU
Micronutrients / kg of brute matter	
Copper sulfate pentahydrate	570 mg
Copper chelate of glycine hydrate	30 mg
Zinc oxide	3560 mg
Zinc chelate of glycine hydrate	190 mg
Manganese oxide	3000 mg
Anhydrous calcium iodate	55 mg
Cobalt basic carbonate monohydrate	25 mg
Sodium selenite	18 mg

3. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle

3.1. Article 4: Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age

Morgane Robles, Emilie Nouveau, Camille Gautier, Luis Mendoza, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Bénédicte Lagofun, Marie-Christine Aubrière, Jean-Philippe Lejeune, Isabelle Caudron, Isabelle Guenon, Catherine Viguié, Laurence Wimel, Hélène Bouraima-Lelong, Didier Serteyn, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer.

Soumis à PLOS One, en révision.

Cette publication présente l'effet de l'obésité maternelle durant toute la gestation sur le métabolisme maternel et le développement des poulains jusqu'à 18 mois.

- L'**état corporel** des juments durant la gestation et la lactation a été suivi par notation de l'état corporel,
- Les **concentrations en nutriments plasmatiques** (glucose, acides gras non estérifiés, triglycérides et urée) ont été mesurées chez les juments entre 6 et 10 mois de gestation,
- La **croissance osseuse** des poulains a été suivie par mesures de la hauteur au garrot et du périmètre thoracique jusqu'à 18 mois,
- Le **métabolisme glucidique** des juments et des poulains a été estimé par un FSIVGTT modifié à 300 jours de gestation chez les juments et à 6, 12 et 18 mois chez les poulains,
- Le **métabolisme adipocytaire** a été analysé chez les juments gestantes et les poulains en croissance par dosage des concentrations plasmatiques de leptine et d'adiponectine,
- L'**inflammation systémique** a été estimée en mesurant les concentrations plasmatiques en sérum amyloïde A des juments gestantes et des poulains en croissance,
- La **maturation testiculaire** des poulains prépubères a été estimée par analyse RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la maturation testiculaire,
- Le **statut ostéoarticulaire** a été suivi par radiographie à 6, 12 et 18 mois.

En conclusion, les juments obèses étaient plus résistantes à l'insuline, avaient une inflammation systémique augmentée et une diminution de la concentration plasmatique en urée pendant la gestation. Les poulains des deux lots avaient la même croissance jusqu'à 18 mois, mais les poulains des juments obèses étaient plus résistants à l'insuline à 6 et 12 mois, avaient une inflammation systémique augmentée jusqu'à 6 mois. Enfin, à 12 mois, plus de poulains nés de juments du lot Obèse avaient des lésions d'ostéochondrose que de poulains nés de juments du lot Normal.

Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age

Robles M[1], Nouveau E[1], Gautier C[2], Mendoza L[3], Dubois C[4], Dahirel M[1], Lagofun, B[1], Aubrière M-C[1], Lejeune J-P[3], Caudron I[3], Guenon I[2], Viguié C[5], Wimel L[4], Bouraima-Lelong H[2], Serteyn D[3], Couturier-Tarrade A[1], Chavatte-Palmer P[1]+.

+ corresponding author: pascale.chavatte-palmer@inra.fr

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

2 Normandie Univ, UNICAEN, EA2608, OeReCa, USC-INRA 2006, Caen, France,

3 Clinique Equine, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Liège, Belgium,

4 IFCE, Station Expérimentale de la Valade, Chamberet, France

5 INRA, UMR Toxalim, Research Center in Food Toxicology, Toulouse, France

Abstract

Obesity is a growing concern in horses. The effects of maternal obesity on maternal metabolism and low-grade inflammation during pregnancy, as well as offspring growth, metabolism, low-grade inflammation, testicular maturation and osteochondrotic lesions until 18 months of age were investigated.

Twenty-four mares were used and separated into two groups at insemination according to body condition score (BCS): Normal (N, n=10, BCS ≤4) and Obese (O, n=14, BCS ≥4.25). BCS and plasma glucose, insulin, triglyceride, urea, non-esterified fatty acid, serum amyloid A (SAA), leptin and adiponectin concentrations were monitored throughout gestation. At 300 days of gestation, a Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test (FSIGT) was performed. After parturition, foals' weight and size were monitored until 18 months of age with plasma SAA, leptin, adiponectin, triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) and cortisol concentrations measured at regular intervals. At 6, 12 and 18 months of age, FSIGT and osteoarticular examinations were performed. Males were gelded at one year and expression of genes involved in testicular maturation analysed by RT-qPCR.

Throughout the experiment, maternal BCS was higher in O *versus* N mares. During gestation, plasma urea and adiponectin were decreased and SAA and leptin increased in O *versus* N mares. O mares were also more insulin resistant than N mares with a higher glucose effectiveness. Postnatally, there was no difference in offspring growth between groups. Nevertheless, SAA plasma concentrations were increased in O *versus* N foals until 6 months, with O foals being consistently more insulin resistant with a higher glucose effectiveness. At

12 months of age, O foals were significantly more affected by osteochondrosis than N foals. All other parameters were not different between groups.

In conclusion, maternal obesity altered metabolism and increased low-grade inflammation in both dams and foals. The risk of developing osteochondrosis was also higher in foals born to obese dams.

Introduction

The influence of maternal environment on offspring long-term health has been demonstrated since the early nineties [1]. Many epidemiological studies in humans and experimental studies in animals have shown that maternal environment such as nutrition, metabolism or parity affects the *in utero* and post-natal development of the offspring, leading to increased susceptibility of developing non-communicable diseases at adulthood [2–4]. This concept is called the Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD) and has also been demonstrated in the horse [5].

In the equine species, the body condition can be measured by using the body condition score (BCS) method. The BCS is a subjective method based on global sight of the animal and palpation of selected areas [6–9]. There are currently two different scales used in the world: the 1-9 scale and the 1-5 scale [8,9]. The optimal BCS is set as 3/5 and 6/9 depending on the scale and a horse is considered fat with a BCS 4/5 and >8/9 in both systems [8,9]. Even if this method is largely used to estimate the fat content of a horse, there is yet no consensus on when is a horse overweight or obese based on these scales.

In the equine industry, obesity is a growing concern, especially since horses are increasingly being regarded as pets [10]. Surveys in Europe, North America, Australia and New-Zealand indicate that 2 to 72% of horses are considered as overweight and 1 to 19% as obese [11–26], with the lowest incidence observed in athletic horses involved in competition. Indeed, results vary depending on country, use of horses (leisure, competition) and season. Moreover, it has also been shown that horse owners consistently underestimate the body condition of their horses [12,14,17,21,23,24,27,28].

In feral or outdoor breeding conditions, the body condition of healthy horses varies depending on the availability of nutriments and thus with season, horses and ponies being fatter in summer than in winter [11,19,22,29–32]. Subsequently, it has been proposed that obesity in horses is defined as a stable obese condition (BCS>4) throughout the year, with no seasonal variation [11,33].

In horses, obesity has been linked to metabolic pathologies such as the equine metabolic syndrome, insulin resistance, alterations in adipose tissue endocrine function, low-grade inflammation and laminitis [34–42]. Moreover, decreased performances in races have been linked to higher body condition scores [43,44]. In terms of reproduction, winter anoestrus is reduced or absent in obese mares [45]. Foaling parameters do not appear to be affected by obesity [46,47]. So far, studies looking at effects of maternal obesity on foal development only focused on mares that were overfed during pregnancy and became obese at foaling [7,48]. To our knowledge, no data is available for mares that were already obese at the time of insemination.

The present study aims to investigate the effects of maternal obesity at the time of insemination on maternal metabolism and low-grade inflammation during gestation, and on foal growth, metabolism, low-grade inflammation, testicular maturation and osteoarticular lesions (focusing on osteochondrosis) until 18 months of age.

Materials and methods

Animals

Ethical statement

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

Experimental design, management and feeding of mares and foals

All animals were vaccinated and dewormed as for standard care. The experimental design is presented in Fig 1. Twenty-four multiparous barren mares (saddlebred) were artificially inseminated with the

same stallion between the 5th of May and the 5th of July. They were divided into two groups according to body condition score (BCS, 1-5 scale). Ten mares (group Normal (N), mean age 7.9 years; range 6-12) had a BCS≤4 at insemination, with significant variation (mean 3.0, range 2-3.8) as barren mares during the previous year. Fourteen mares (group Obese (O), median age 8.6 years; range 6-11) had a BCS ≥4.25 at insemination that had been relatively stable during the previous year (mean 3.8, range 3.1-4), regardless of the nutritional offer (Fig 1 A).

From insemination to 6 months of gestation, pregnant mares were conducted in one group in the same pastures with free access to water and mineral salts (Krouner Rumi, CTH, France). From the 6th month of gestation, mares were housed in individual boxes and fed a diet based on hay, haylage and flattened barley with vitamins and minerals until foaling (Excel-Prima-S, Chauveau Nutrition, France), providing the same amount of energy, protein, fibres, calcium and phosphorus according to body weight (Fig 1 B, Fig 2, Supplementary Table 1).

Mares and foals returned to pasture 3 days after foaling (between the 30th of April and the 17th of June) and were kept in one herd in the same pasture until weaning at 6 months of age (between the 5th and the 23rd of November). In their first winter, foals were housed in open barns and fed hay and homemade pellets containing barley, soybean cake, molasses and vitamins and minerals (Excel-Prima-S, Chauveau Nutrition, France) twice a day using a collective feeder, in agreement with current recommendations for growing foals [49] (Supplementary Table 2). The animals were separated in three groups according to body weight in order to reduce the competition for food. Six months after weaning (April 25th, at 12 months of age), yearlings were returned to pasture and managed in one same herd with free access to water and a vitamin and minerals supplement (Supplementary Table 3) until 18 months of age (Fig 1 C).

Figure 1: Experimental design.

A. The year before insemination, the body condition score of barren mares was monitored. Normal (N, n=10) mares had a fluctuant body condition score relevant to the nutritional offer whereas Obese (O, n=14) mares had a high and stable body condition during the year.
B. From insemination until 6 months of gestation, pregnant mares were pastured as one same herd in the same pasture. From the 6th month of gestation, they were housed in individual boxes and fed the same amount of energy, proteins, fibre, calcium and phosphorus according to body weight until foaling.
C. From 3 days until 6 months of age, foals were kept in pasture with their dam. They were weaned by abrupt separation at 6 months, housed in open barns and fed the same amount of feed, following the French recommendations for growing foals [49]. Colts were castrated at 12 months as a routine procedure. From 12 to 18 months of age, all yearlings pastured in the same pasture.

A.I.: Artificial insemination, BCS: body condition score.

Figure 2: Daily nutritional offer (median and IQR) for Normal (N) and Obese (O) broodmares from wintering at 180 days of gestation until foaling. There are no significant differences between groups. Net energy (A), horse digestible crude proteins (B), raw cellulose (C), and calcium to phosphorus ratio (D). BW: bodyweight.

Body measurements and blood sampling of mares and foals

All measurements and sampling were performed without analgesia or anaesthesia.

Each month from insemination until weaning, mares were weighed and their BCS measured by two trained, independent operators [50]. Jugular vein blood samples were collected into EDTA-coated tubes monthly during pregnancy, in the morning (between 8:00 and 9:00 A.M) before the first meal of the day, to measure plasma glucose, insulin, triglyceride (TG), non-esterified fatty acid (NEFA), urea, leptin, adiponectin and serum amyloid A (SAA) concentrations.

All mares foaled naturally and foaling was supervised. At birth before suckling and at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 and 18 months, foals and yearlings were weighed and withers' height and thoracic perimeter measured. The BCS of yearlings was measured at 330, 450, 480 and 600 days of age by two trained, independent operators. Jugular vein blood samples were collected into EDTA-coated tubes at birth before suckling and at 1, 3, 6 and 12 months in the morning (before the first meal during wintering), to measure plasma leptin, adiponectin and SAA concentrations. At 4 months, foals were catheterized at the jugular vein. After 30 minutes, 3 blood samples were collected into tubes coated with a coagulation activator at 30 min intervals to measure serum cortisol concentration.

Evaluation of glucose metabolism in mares, foals and yearlings

Modified frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIGT)

Modified FSIGT were performed at 300 days of gestation in mares and at ages 6, 12 and 18 months in foals and yearlings. The FSIGT is a method that enables the simultaneous evaluation of insulin sensitivity and glucose tolerance [51]. This method does not require overnight fasting so animals had free access to hay and water during the test. Both jugular veins were catheterized (Introcan, BBraun, Germany) 30min before the beginning of the test. One catheter was used for infusion and the other one for sampling. Glucose (0.30g/kg) was injected over 2 min (age 6 months), 4 min (age 12 months) and 5 min (mares at 300 days of gestation and yearlings at age 18 months) and 10 ml samples were collected into EDTA-coated tubes at -5 min and 5, 7, 13 and 19 min after the glucose injection started. At 20 min, a diluted solution of 15mUI/kg insulin (Umuline Eli Lilly, USA) was injected over 1 min. Blood was collected 5, 15, 25, 40, 70, 100, 130 and 160 min after insulin injection. Plasma glucose concentration was immediately analyzed using a glucometer (Freestyle optium, Abbott, USA). Samples were kept on ice until centrifugation (0-2 h). Samples were stored at -20°C until use.

Insulin assays

Plasma insulin concentrations were measured using an AlphaLISA human insulin immunoassay kit (PerkinElmer, USA) as previously described and validated [52].

Calculation of glucose homeostasis parameters from modified FSIGT assays

Glucose effectiveness (Sg), acute insulin response to glucose (AIRg), insulin sensitivity (SI) and the disposition index (DI) were calculated using the Bergman's minimal model [51,53,54] on the MinMod Millennium software (Ver 6.02, MINMOD Inc., 2001) [55]. A schematic representation of the Bergman's minimal model has been described previously [52].

Briefly, glucose and insulin are produced and released by the liver and the pancreas respectively in a basal state (basal glucose plasma concentration, Gb; basal insulin plasma concentration, Ib). After a meal, or an intra-venous injection of glucose, plasma glucose concentrations increase. From the blood compartment, the glucose will enter the peripheral tissues by two types of glucose transporters, leading to the measurement of different indices:

- **By insulin independent glucose transporters**. The glucose efficiency (Sg) index is the capacity of the glucose to mediate its own disposal independently of insulin and to suppress endogenous glucose production.

-**By insulin dependent glucose transporters**. The elevated level of plasma glucose induces the production of insulin by the pancreas. The acute insulin response (AIRg) index represents the production of insulin by the pancreas during the first 10 minutes after glucose injection and reflects β-cells responsiveness. Insulin is transferred into the interstitial space (P3, insulin introduction rate) from the bloodstream and reaches the peripheral tissues to mediate glucose disposal by insulin dependent glucose transporters (X, insulin action). With time, insulin action declines at a rate calculated by the P2 proxy. The Insulin sensitivity (SI) index is then calculated as P2/P3.

Finally, the disposition index (DI) (calculated as the product of SI and AIRg) is used to describe the whole-body insulin sensitivity.

Biochemical analyses

Plasma TG, NEFA and urea analyses. Plasma TG, NEFA and urea concentrations were measured in mares in duplicate by an enzymatic-colorimetric method with a Cobas Mira-analyzer, using commercial kits (TG: Provet triglycerides SL, Kitvia, France; NEFA: NEFA-HR kit, Wako Chemicals GmbH, Germany; urea: Provet urea SL,Kitvia, France) and following the manufacturers' instructions.

Plasma leptin and adiponectin analysis. Plasma leptin and adiponectin concentrations were measured in mares, foals and yearlings in duplicate using an alphaLISA human leptin and adiponectin immunoassay kit (PerkinElmer, USA) following the manufacturer's instructions, as described previously for insulin [52].

For leptin, the minimum level of detection was 0.26ng/mL. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 8% and 8.3%, respectively. For adiponectin, the minimum level of detection was 0.019ng/mL. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 8% and 8.9%, respectively. The assays were validated by dilutional parallelism between standard curve and endogenous leptin or adiponectin and expected values against obtained values (Supplementary Figures 4 and 5).

Plasma SAA analysis. Plasma SAA concentrations were measured in mares, foals and yearlings in duplicate with a commercial multi-species ELISA kit following the manufacturer's instructions (Phase™ range SAA kit, Tridelta Development Ltd, Ireland). This commercial kit has been validated for use in horses by the manufacturer.

Serum cortisol analysis. Serum cortisol concentrations were measured in foals at birth before suckling and at 4 months of age in duplicate with a commercial human RIA kit following the manufacturer's instructions (CORT-CT2, CISbio International, France).

Thyroid hormones analysis. Total T3 and total T4 were assayed using MP Biomedicals (Solon, USA) radiommunoassay kits in aliquots of 25 or 10 µl and 50 to 200µl, for T4 and T3, respectively. These assays were validated for horse serum by measuring T3 and T4 in horse plasma spiked with four

different concentrations levels: 0, 20, 50 and 100ng/ml and 0, 1, 2.5 and 5ng/ml for T4 and T3, respectively. For T4 assay, mean inter- and intra-assay CVs were 16.0 and 5.7%, respectively and mean exactitude according to expected concentrations in spiked samples was -12.4%. For T3, mean inter- and intra-assay CVs were 9.4 and 13.4%, respectively and mean exactitude according to expected concentrations in spiked samples was -14.5%.

Testis

Tissue sampling and treatment

Testes from prepubertal stallions (group N: n=7, mean age 304 days, range 265-319 and group O: n=7, mean age 306 days, range 281-314) were collected during routine castration. Samples were snap frozen on dry ice and stored at -80°C.

Quantitative real time PCR

Total mRNA was extracted with Tri-Reagent kit (Sigma-Aldrich, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and PCR reactions were performed as previously described [52]. The relative gene expression was normalized with *GAPDH* RNA expression.

The genes analysed were markers of testicular maturity (*Cyp19, Connexin 43, AR, STAR* [56–58]), markers of immaturity (*AMH* [59]) and genes involved in the establishment of the blood-testis barrier (*Occludin, N Cadherin*) . Primer sequences are presented in Table 1.

Table 1. Primers sequences used for amplification of equine products in RT-qPCR assays in testicles of prepubertal stallions

Gene	GenBank accession number	Primer	Size of PCR product (pb)
Anti-müllerian hormone (AMH)	JF330269,1	Forward: 5' - CCATCTGGAGGAGCCAAC - 3' Reverse: 3' - CCCGTGACAGTGACCTCAG - 5'	80
Androgen Receptor (AR)	NM_001163891,1	Forward: 5' - AGTACTCCTGGATGGGGCTT - 3' Reverse: 3' - TGTACATCCGGGACTTGTGC - 5'	132
Connexin 43 (Cx43)	XM_005596901,1	Forward: 5' - CTCTTCACCAACCGCTCCT - 3' Reverse: 3' - CTGTCTCCGGTAACCAGCTT - 5'	68
Cyp 19	NM_001081805,1	Forward: 5' -AAAGCCACCCGGTTCCTAAC- 3' Reverse: 3' -CCTTGATCTCAGGCGAAGCA- 5'	119
N Cadherin	XM_001495782,3	Forward: 5' -GCCATTCAGACTGACCCGAA- 3' Reverse: 3' - CTGCAGCGACAGTAAGGACA- 5'	100
Occludin	XM_001504044,3	Forward: 5' -AAGCTTCCATGTCAGTGCCTT- 3' Reverse: 3' -TTGCTTGGTGCGTAATGATTGG - 5'	84
Steroidogenic Acute Regulatory Protein (STAR)	NM_001081800,1	Forward: 5' - TGGCCTATATCCAGCAGGGA- 3' Reverse: 3' -AATACCTTGCCCACGTCTGG- 5'	142

Radiographic evaluation of osteoarticular status in yearlings

Radiographic examination at 6, 12 and 18 months of age was performed based on 8 X-rays of the hock, stifle and fetlock as recommended by Denoix and collaborators [52,60]. Foals and yearlings were sedated using butorphanol (Dolorex®, 0.02mg/kg IV, Intervet, USA) combined with romifidine (Sedivet®, 0.06mg/kg IV, Intervet, USA) when needed. OC was diagnosed blindly by two experienced examinators according to the presence of lesions that were previously described [61–63]. Yearlings were classified as OC-positive according to the presence of one or more OC lesions identified by both examiners.

Statistical analysis

Results are expressed as median [quartile 1 – quartile 3] and presented as curves (median and interquartile range IQR) or boxplots (minimum to maximum). Statistical analyses were performed using the R software (http://www.r-project.org, version 3.4.0.).

The longitudinal data (mare weight and BCS, plasma concentrations in mares and foals and foals' metabolic tests) were analysed using a type III ANOVA (*car* package [64]) on a mixed linear model (*nlme* package[65]) taking into account group (N or O), time and the interaction group:time as fixed effects and the individual as random effect. Age of the mare and sex of the foal were included in the model when statistically significant. When time and/or group:time interaction were statistically significant, a post-hoc Tukey test was applied using the *lsmeans* package [66]

Foal and yearling measurements were analysed using a mixed quadratic model considering the group (N or O), the age of the foal (from birth to 18 months of age) and the interaction group:age of the foal as fixed effects and the foal as random effect. When age and/or group:age interaction were statistically significant, a post-hoc Tukey test was applied using the *lsmeans* package. Age of the mare and sex of the foal were not statistically significant at any time and were subsequently not included in the model.

Metabolic tests performed in mares in late gestation were analysed using a type III ANOVA (*car* package) on a fixed linear model considering the group (N or O) and age of the mare.

Testicular data were analysed using a Principal Component Analysis of the FactoMineR package [67]. The age and weight of the foal at gelding did not affect any of the results and were therefore not included in the final analysis.

Radiographic results were analysed using a chi-squared test.

Effects were considered significant when p-values<0.05.

Results

Effect of obesity in mares

Bodyweight and BCS in mares

Gestation and lactation bodyweight and BCS of mares are shown in Fig 3. There was no difference between groups for maternal weight from insemination until weaning. O mares, however, gained weight from wintering at 180 days of gestation until 300 days of gestation ($p<0.0001$) but N mares did not.

O mares had a higher BCS than N mares from insemination until the month before weaning of the foals ($p<0.0001$). N mares lost body condition from 180 days of gestation to foaling ($p<0.0001$) whereas O mares did not. N mares gained body condition between foaling and weaning of foals at 180 days of age ($p<0.0001$) but O mares did not, so that altogether, the body condition of O mares did not vary very much in contrast to that of N mares.

Figure 3. Bodyweight (A) and body condition score (B) of mares (median and IQR) throughout pregnancy and lactation. For each time point, asterisks indicate a significant difference ($p<0.05$).

Glucose homeostasis in mares

Data from glucose metabolism analyses are presented in Fig4 and Table 2.

There was no difference for basal glucose and insulin plasma concentrations between groups from 180 to 300 days of gestation. Glucose plasma concentrations decreased with pregnancy ($p<0.0001$) while insulin plasma concentration increased ($p<0.001$). There was no difference between groups for acute pancreatic response (AIRg), disposition index (DI), basal glucose and insulin concentrations.

At 300 days of gestation, however, O mares were more insulin resistant than N mares ($p=0.001$) and had a higher Sg (glucose effectiveness, $p=0.02$).

Figure 4. Basal plasma glucose (A) and insulin (B) concentration in pregnant Normal (n=10) and Obese (n=14) mares between 180 and 300 days of gestation. For each time point, asterisks indicate a significant difference between groups ($p<0.05$) and “T” indicate a tendency for a difference between groups ($p<0.10$).

Table 2. Indexes calculated with the Bergman's minimal model (median and IQR): acute insulin response to glucose (AIRg), insulin sensitivity (IS), disposition index (DI) and glucose effectiveness (Sg), basal plasma glucose (GB) and basal plasma insulin (IB) in Normal (n=10) and Obese (n=14) mares at 300 days of gestation.

	Normal (n=10)	**Obese (n=14)**	**P value**
AIRg mUI.min.L^{-1}	72.3 [43.3-112.7]	101.6 [64.0-205.1]	NS
SI x10^{-4} L.mUI^{-1}.min^{-1}	**1.9 [1.0-2.4]**	**0.5 [0.4-0.9]**	**<0.01**
DI x10^{-2}	123.2 [93.1-182.7]	83.7 [32.3-155.3]	NS
Sg x10^{-2}.min^{-1}	**0.008 [0.004-0.009]**	**0.011 [0.010-0.013]**	**0.02**
GB mg.dL^{-1}	104 [95-116]	103 [91-118]	NS
IB mUI.L^{-1}	21.1 [15.3-31.9]	29.8 [20.1-41.1]	NS

Plasma biochemistry in mares

Plasma biochemistry results are shown in Fig 5.

There was no difference between groups for TG and NEFA plasma concentrations between 30 and 300 days of gestation (Figure 5A and 5B). Plasma NEFA concentrations, however, increased from wintering at 180 days of gestation to 300 days of gestation (p=0.0001) in both groups.

Plasma urea concentrations tended to be decreased in O compared to N mares when comparing all measurements throughout gestation (p=0.07) (Figure 5C). Indeed, plasma urea concentrations were reduced in O compared to N mares at 90 (p<0.01) and 120 (p=0.01) days of gestation and tended to be reduced at 180 (p=0.08) and 300 (p=0.08) days of gestation. Plasma urea concentration decreased between 120 and 180 days of gestation (p<0.0001) in both groups of mares.

Altogether, plasma SAA concentrations were higher in O compared to N mares (p=0.04) from 30 days of gestation to foaling. Plasma SAA concentrations were higher in O mares at 90 days (p<0.01) and tended to be higher at foaling (p=0.06).

Figure 5. Plasma triglycerides (A), non-esterified fatty acid (B), urea (C) and Serum amyloid A (D) concentration in pregnant Normal (n=10) and Obese (n=14) mares between 30 and 300 days of

gestation or foaling. For each time point, asterisks indicate a significant difference between groups ($p<0.05$) and "T" indicate a tendency for a difference between groups ($p<0.10$).

Plasma endocrinology in mares

Plasma concentrations of leptin and adiponectin are shown in Fig 6.

From 180 days of gestation to foaling, O mares had higher plasma leptin and lower plasma adiponectin concentrations than N mares ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectively).

Moreover, there was a negative linear correlation between leptin plasma concentration and SI ($p<0.01$, adjusted $r^2=0.29$) and a positive linear correlation between adiponectin plasma concentration and SI ($p<0.01$, adjusted $r^2=0.31$) at 300 days of gestation.

Figure 6. Plasma leptin (A) and adiponectin (B) concentrations in pregnant Normal (n=10) and Obese (n=14) mares from 180 days of gestation to foaling and correlations between insulin sensitivity calculated using the Bergman's minimal model and plasma leptin concentrations (C) or plasma adiponectin concentrations (D) at 300 days of gestation. For each time point, asterisks indicate a significant difference between groups ($p<0.05$) and "T" indicate a tendency for a difference between groups ($p<0.10$).

Effect of maternal obesity in foals

Body measurement in foals

Growth of foals is shown in Fig 7.

There was no difference in growth between groups from birth to 18 months of age. There was no difference in BCS from 330 to 600 days of age.

Figure 7. Body weight (A), wither's height (B), thoracic perimeter (C) and body condition score (D) in Normal (n=10) and Obese (n=14) growing foals and yearlings. There was no difference between groups.

Glucose homeostasis in foals

Data from glucose metabolism analyses are shown in Table 3.

At 6 and 18 months of age, O foals had a reduced SI compared to N foals (p<0.0.001, p=0.03, respectively). Sg was also reduced in O foals at 18 months of age (p=0.002).

AIRg, Sg and basal glucose increased with age (p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001, respectively) whereas SI decreased with age (p<0.0001).

Table 3. Proxies calculated with the Bergman's minimal model (median and IQR): acute insulin response to glucose (AIRg), insulin sensitivity (IS), disposition index (DI) and glucose effectiveness (Sg), basal plasma glucose (GB) and basal plasma insulin (IB) in Normal (n=10) and Obese (n=14) foals and yearlings at 6, 12 and 18 months of age. Different suffixes indicate a significant difference between groups (p<0.05)

	6 months		**12 months**		**18 months**		**Time p value**
	Normal (n=10)	**Obese (n=14)**	**Normal (n=10)**	**Obese (n=14)**	**Normal (n=10)**	**Obese (n=14)**	
AIRg mUI.min.L^{-1}	14.9 [11.1-37.6]	30.9 [8.1-39.2]	68.1 [47.9-84.9]	80.7 [70.7-89.6]	80.2 [31.3-84.5]	65.8 [54.4-111.1]	<0.0001
SI x10^{-4} L.mUI^{-1}.min^{-1}	**17.2 [9.5-26.9]^{a}**	**4.5 [3.4-7.9]^{b}**	1.9 [1.5-2.3]	2.4 [1.4-2.5]	**5.6 [1.5-7.9]^{a}**	**0.9 [0.6-2.6]^{b}**	<0.0001
DI x10^{-2}	290.9 [145.1-400.9]	115.7 [37.9-330.8]	122.9 [89.9-160.6]	119.6 [107.1-197.6]	246.7 [165.5-324.6]	67.6 [42.9-173.1]	0.06
Sg x10^{-2}.min^{-1}	0.009 [0.003-0.013]	0.009 [0.007-0.014]	0.010 [0.006-0.012]	0.008 [0.005-0.011]	**0.022 [0.016-0.030]^{a}**	**0.010 [0.006-0.015]^{b}**	<0.0001
GB mg.dL^{-1}	87.5 [85.5-99.5]	93.8 [87.1-100.4]	117.8 [111.8-125.3]	123.0 [107.5-127.5]	111.3 [96.5-120.5]	123.5 [105.9-146.4]	<0.0001
IB mUI.L^{-1}	8.7	9.6	5.9	8.0	7.6	9.4	NS

	[8.2-12.1]	[9.4-10.5]	[5.4-9.6]	[6.3-11.5]	[4.0-10.0]	[5.0-12.0]

Chronic low-grade inflammation in foals

Chronic low-grade inflammation as evaluated by plasma SAA concentrations are shown in Fig 8.

Altogether, plasma SAA concentrations were higher in O compared to N foals throughout growth ($p=0.048$). O foals tended to have higher plasma concentrations at birth ($p=0.08$) and this difference was significant at 3 ($p<0.01$) and 6 ($p=0.01$) months of age.

Figure 8. Plasma Serum amyloid A concentrations in Normal (n=10) and Obese (n=14) foals and yearling from birth to 12 months of age. For each time point, asterisks indicate a significant difference between groups ($p<0.05$) and "T" indicate a tendency for a difference between groups ($p<0.10$).

Foal endocrinology

Plasma concentration of leptin and adiponectin from birth to 12 months of age and that of T3 and T4 from birth to 18 months of age are shown in Fig 9.

Serum concentrations of cortisol at birth and at 4 months did not differ between groups. Serum cortisol concentrations decreased between birth and 4 months of age ($p<0.0001$).

Plasma leptin and adiponectin concentrations did not differ between groups. Plasma leptin concentrations increased with foal age ($p=0.03$) but plasma adiponectin did not.

Plasma T3 and T4 concentrations did not differ between groups at any age. Both decreased markedly between birth and 3 months of age ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectively) and plateaued thereafter.

Figure 9. Serum cortisol (A), plasma leptin (B), adiponectin (C), T3 (D) and T4 (E) concentrations in Normal (n=10) and Obese (n=14) foals and yearling between birth and 12 or 18 months of age. For each time point, asterisks indicate a significant difference between groups ($p<0.05$).

Testes

It was not possible to discriminate between groups using the Principal component (Supplementary Figure 6).

Osteochondrosis

The osteochondrosis status of foals and yearling aged 6, 12 and 18 months is shown in Table 4.

The proportion of foals and yearlings with lesions did not differ between groups at 6 and 18 months of age. At 12 months of age, however, more yearlings of O group (6 over 13) were affected with osteochondrosis lesion than foals of N group (1 over 10, p=0.03).

Table 4. Number (and percentage) of osteochondrosis (OC) negative and positive Normal (n=10) and Obese (n=14) foals and yearlings at 6, 12 and 18 months. The proportion of OC-positive foals and yearlings was not different at 6 and 18 months between groups but there were more OC-positive O yearlings at 12 months compared to N yearlings (p=0.03).

Age	**6 months**			**12 months**			**18 months**		
	OC-negative	OC-positive	P-value	OC-negative	OC-positive	P-value	OC-negative	OC-positive	P-value
Group "Normal"	7 (70%)	3 (30%)	NS	**9 (90%)**	**1 (10%)**	**0.03**	9 (90%)	1 (10%)	NS
Group "Obese"	9 (64%)	5 (36%)		**6 (47%)**	**7 (53%)**		9 (69%)	4 (30%	

Discussion

In the present study, obese mares were fatter than normal mares from insemination until the end of lactation. Obese mares were more insulin resistant in late gestation, their nitrogen metabolism was altered and they had low-grade inflammation. Moreover, plasma leptin concentrations were increased whereas plasma adiponectin concentration were decreased in obese mares during gestation.

There was no difference in foal birthweight nor subsequent growth between groups. Nevertheless, similar to their dams, foals born to obese mares had an increased low-grade inflammation until 6 months of age compared to controls born to normal dams. They were also more insulin resistant at 6 and 18 months of age. Testicular maturation did not differ between groups but more foals born to obese mares had osteochondrosis lesions than foals born to normal mares at 12 months of age.

Effect of obesity in pregnant and lactating mares

When they were barren the year before, N mares had a body condition that varied with nutritional offer while O mares had a high, stable body condition. Again, when pregnant, N mares lost body condition at the end of gestation while O mares maintained their body condition. After foaling, when in pasture, all mares lost body condition during the first months of lactation, but O mares remained fatter. It is important to note that the loss of body condition during lactation occurred at a time of very hot climatic conditions that reduced the nutritional offer to the lactating mares (Supplementary File 7). Thus, despite the drop in BCS during lactation, obese mares can be still considered obese as their BCS was rather stable over the two years and always higher than the body condition of normal mares [11,33].

The increased BCS in the obese group was associated, as excepted, with elevated plasma leptin concentrations and decreased plasma adiponectin concentrations in late gestation. These two adipokines are produced by the adipose tissue. In the horse, plasma leptin concentrations are correlated with fat mass while adiponectin concentrations are inversely correlated with fat mass (quantity and BSC) [68–71]. Moreover, it has been shown that insulin resistant obese horses have a higher leptin plasma concentration than insulin sensitive obese horses [35,72]. The observed inverse correlation between plasma leptin concentrations and SI are in agreement with those observations. Similarly, adiponectin is known to improve insulin sensitivity by stimulating adipose tissue and skeletal muscle glucose disposition [73,74] and this is in agreement with the observed positive correlation between adiponectin plasma concentration and SI at 300 days of gestation. Furthermore, adiponectin

possesses anti-inflammatory properties and has been shown *in vitro* to decrease cytokine secretion, macrophage pro-inflammatory activity and sensitivity to pro-inflammatory stimuli, as well as to enhance the production of anti-inflammatory cytokines [75–77]. Studies in humans show that plasma adiponectin concentrations are inversely correlated with plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines [78,79]. In the non-pregnant horses and ponies, overnutrition with a diet rich in carbohydrates decreases the plasma concentration of adiponectin and significantly increases plasma SAA concentration [34]. Here, obese mares with low adiponectin plasma concentrations had transiently increased SAA plasma concentrations, in accordance with the lower plasma adiponectin concentrations.

In terms of blood biochemistry, plasma NEFA and triglyceride concentrations were not modified in obese mares in contrast to what is observed in humans [80]. In horses, however, hypertriglyceridemia and increased NEFA plasma concentrations are not always observed in case of obesity [35,81,82].

Obese mares had a decreased concentration of plasma urea compared to normal mares during gestation. In the rat, obesity due to overnutrition decreases the hepatic production of urea, due to the reduced activity of enzymes involved in the urea cycle [83]. In agreement with these observations, obese growing pigs have lower serum urea concentrations than lean pigs [84]. Moreover, plasma amino acid concentrations are modified together with a decrease in hepatic concentrations of gluconeogenic amino acids in prediabetic rats [85]. The decreased urea plasma concentrations observed in obese mares during gestation may be then associated with a shift between amino acid and glucose metabolism in the liver and a decreased hepatic urea production.

Obese mares were more insulin resistant at 300 days of gestation and had a higher glucose effectiveness (Sg, the glucose disposition mediated by insulin independent glucose transporter). The increase of Sg has been previously observed in obese horses that were insulin resistant as observed in the present study [38]. As insulin resistance was increased in obese horses, the increased Sg may be a

compensation to avoid prolonged hyperglycaemia, perhaps due to an increased number or activity of the insulin independent transporters.

In conclusion, obese mares were characterized by an increased fat mass during two consecutive years, although being fed the same quantity and quality of feed than normal mares, altered carbohydrate and nitrogen metabolism as commonly observed in the obese state and increased low-grade inflammation during the second half of gestation.

Effect of maternal obesity in growing foals and yearlings until 18 months of age

In the present study, we did not observe any difference for growth in foals and yearlings. Only strong alterations of maternal environment such as embryo transfer with breeds differing widely in size , pathology or severe undernutrition have been shown to affect the *in utero* and/or post-natal growth of horses [5]. One study observed a positive correlation between the mean BCS during all pregnancy of the pregnant mare and the birth weight of the foal, but this correlation was very weak (r^2=0.04) [81]. Moreover, foals born to overnourrished mares in gestation that reached obesity at parturition had the same weight at birth than foals born to lean mares [47] but were lighter (-12.2kg, -10%) and smaller (-4cm, -4%) at 2 months of age, possibly due to a decreased milk yield in obese mares [48]. It seems then unlikely that maternal BCS during gestation affects the *in utero* growth of foals. However, Kubiak et al. (1991) were not able to discriminate the effects of maternal overnutrition from the effects of maternal obesity to explain the difference of foal's growth between birth and 2 months of age [48].

Here, in agreement with the data on growth, there was no difference for thyroid hormone concentrations between groups. In the growing horse, thyroid metabolism has been scarcely described. As observed earlier, thyroid hormones concentrations were elevated at birth and decreased with age [86–90]. In foals, alterations of their concentrations at birth or during growth have been associated with dysmaturity at birth, overgrowth or disease [86,90,91]. Moreover, in horses, hypothyroidism has never been demonstrated to be linked with the equine metabolic syndrome, a

pathology defined by regional and or/overall adiposity, insulin resistance, hypertriglyceridemia and hyperleptinemia [41]. Furthermore, thyroidectomize horses do not develop obesity [92].

No difference in testicular maturation were observed between groups. Thyroid hormones have been shown to influence the maturation of Sertoli and Leydig cells in developing testes [93]. IGF-1 has been also shown to stimulate Sertoli cell proliferation in mice [94]. In the growing horse, serum IGF-1 concentrations are correlated with growth [95]. As we did not observe differences in growth, we hypothesize that there was no difference in blood IGF-1 concentrations between groups either.

In line with the absence of difference in growth and thyroid hormones, there was also no difference in plasma leptin nor adiponectin concentrations between groups. In agreement with these observations, foals born to hyperleptinemic mares did not have elevated plasma leptin concentration from birth until 4 days of age [96]. These observations do not exclude a transient elevation of plasma leptin concentrations as others observed that foals born to hyperleptinemic dams had higher leptin plasma concentrations from 6 to 18 hours of age but with no difference at birth and after 24 hours of age compared to control foals [97].

In contrast to the previously discussed lack of differences, O foals had increased SAA plasma concentration compared to N foals until 6 months of age. This observation may be due to differences in the composition of maternal milk as it disappeared at 12 months of age. The increased SAA concentration in O foals until 6 months of age reflects an increased systemic inflammation. In humans and rats, maternal low-grade inflammation associated with obesity is transferred to the offspring, as observed here, in particular in the brain, leading to behaviour changes such as increased anxiety, increased behavioural abnormalities and reduced spatial learning abilities [98,99]. In horses, decreased learning abilities and increased behavioural problems could lead to decreased sports performance and increased dangerous behaviours.

Finally, we observed a link between maternal and post-natal environment on foal development. At 6 and 18 months of age, after being in pasture and/or suckling their dams, O foals were more insulin

resistant than N foals without a difference in terms of osteochondrosis lesions. In contrast, at 12 months of age, after a winter indoors during which they were fed twice a day with concentrates, N yearlings were more metabolically affected by carbohydrate rich meals than O yearlings. This observation is in line with data from a previous study comparing metabolic responses of overfeeding between foals that were insulin resistant at 6 months of age compared to controls [52].

Osteochondrosis is a dynamic, multifactorial disease. Epidemiological and experimental studies have linked osteochondrosis lesions in foals with feeding of pregnant mares and growing foals with cereals [60,100,101]. Moreover, foals that are most affected by osteochondrosis have increased post-prandial blood glucose and insulin compared to non-affected foals [102,103]. *In vitro*, insulin stimulates the differentiation of pre-osteoblasts into osteoblasts [104–107], as well as chondrocyte survival and proliferation [108,109] and cartilaginous growth [110]. Which one of hyperinsulinemia or insulin resistance in chondrocytes is responsible for the defects in cartilage maturation remains unknown. In the present study, post-prandial glucose and insulin plasma concentrations were not analysed. Low-grade inflammation may also play a role as TNF-α and IL-6 are known to inhibit bone growth [111–114]. Moreover, a functional analysis has shown that leukocytes of horses affected by osteochondrosis presented alterations of genes involved in insulin metabolism and inflammation [115]. More work is needed to understand better the role of energy metabolism and low-grade inflammation in cartilage maturation and development of osteochondrosis lesions.

In conclusion, maternal obesity was associated with enhanced insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals. These may affect both physical and behavioural performances at adulthood, with particular importance in a species dedicated to sport and competition.

Conclusion

In the present study, we showed that maternal obesity, associated with insulin resistance, alters the secretion of adipokines and increases low-grade inflammation in pregnant mares. These alterations of maternal environment increase the low-grade inflammation, the insulin resistance and the development of osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age.

We showed here that obesity during gestation may have insidious consequences on health, well-being and then athletic performances of future horses and in the end, affects the worldwide economy and competitivity of the equine industry.

Acknowledgments

This work was funded by grants from the "Institut Français du Cheval et de l'Equitation" and by the "Fonds Eperon" (FOETALIM project). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, nor preparation of the manuscript. The authors are grateful to the staff of the Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) experimental farm (Domaine de la Valade, Chamberet, France) for care and management of animals.

Bibliography

1. Barker D. The origins of the developmental origins theory. Journal of Internal Medicine. 2007. p. 412- 417. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x

2. Hanson M, Gluckman P. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev. 2014;94: 1027- 76. doi:10.1152/physrev.00029.2013

3. Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Kiefer H, Duranthon V, Jammes H. Breeding animals for quality products: not only genetics. Reprod Fertil Dev. 2016;28: 94- 111. doi:10.1071/RD15353

4. McMullen S, Mostyn A. Animal models for the study of the developmental origins of health and

disease. Proc Nutr Soc. 2009;68: 306- 320. doi:10.1017/S0029665109001396

5. Peugnet P, Robles M, Wimel L, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. Theriogenology. 2016; doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.028

6. Arnaud G, Perret G, Dubroeucq H, Rivot D. Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport - Guide pratique. Quae. Institut de l'élevage; 1997.

7. Henneke D, Potter G, Kreider J. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. Theriogenology. 1984;21: 897- 909. doi:10.1016/0093-691X(84)90383-2

8. Henneke D, Polter G, Kreider J, Yeates B. Relationship between condition score , physical measurements and body fat percentage in mares. Equine Vet J. 1983;15: 371- 372. doi:10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x

9. Martin-Rosset W, Vernet J, Dubroeucq H, Arnaud G, Picard A, Vermorel M. Variation of fatness and energy content of the body with body condition score in sport horses and its prediction. In: Saastamoinen M, Martin-Rosset W, éditeurs. Nutrition of the Exercising Horse. Vilnius: Wageningen Academic Publishers; 2008. p. 167–176.

10. Luna D, Vásquez R, Rojas M, Tadich T. Welfare Status of Working Horses and Owners' Perceptions of Their Animals. Animals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017;7: 56. doi:10.3390/ani7080056

11. Giles S, Rands S, Nicol C, Harris P. Obesity prevalence and associated risk factors in outdoor living domestic horses and ponies. PeerJ. 2014;2: e299. doi:10.7717/peerj.299

12. Potter S, Bamford N, Harris P, Bailey S. Prevalence of obesity and owners' perceptions of body condition in pleasure horses and ponies in south-eastern Australia. Aust Vet J. 2016;94: 427- 432. doi:10.1111/avj.12506

13. Jensen R, Danielsen S, Tauson A-H. Body condition score, morphometric measurements and estimation of body weight in mature Icelandic horses in Denmark. Acta Vet Scand. BioMed Central; 2016;58: 19- 23. doi:10.1186/s13028-016-0240-5

14. Wyse C, McNie K, Tannahil V, Love S, Murray J. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. Vet Rec. 2008;162: 590- 591. doi:10.1136/vr.162.18.590

15. Thatcher C, Pleasant R, Geor R, Elvinger F. Prevalence of Overconditioning in Mature Horses in Southwest Virginia during the Summer. J Vet Intern Med. 2012;26: 1413- 1418. doi:10.1111/j.1939-1676.2012.00995.x

16. Hansen A, Catalano D, Coleman R, Hathaway M, McCue M, Rendahl A, et al. Demographics, body condition scores, and owner bodyweight estimations of adult draft and warmblood horse breeds. J Equine Vet Sci. 2015;35: 389. doi:10.1016/j.jevs.2015.03.024

17. Wood S, Allen E, Corr A, Lee M, Magee A. Ability of horse and pony owners to estimate body weight and assess body condition score. European Equine Health & Nutrition Congress 8th Edition. 2016. p. 124- 126.

18. Harker I, Harris P, Barfoot C. The body condition score of leisure horses competing at an unaffiliated championship in the UK. J Equine Vet Sci. 2011;31: 253- 254. doi:10.1016/j.jevs.2011.03.058

19. Fernandes K, Rogers C, Gee E, Bolwell C, Thomas D. Body condition and morphometric measures of adiposity in a cohort of Pony Club horses and ponies in New Zealand. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. Dudenin; 2015. p. 195- 199.

20. Ireland J, Wylie C, Collins S, Verheyen K, Newton J. Preventive health care and owner-reported disease prevalence of horses and ponies in Great Britain. Res Vet Sci. Elsevier Ltd; 2013;95: 418- 424. doi:10.1016/j.rvsc.2013.05.007

21. Stephenson H, Green M, Freeman S. Prevalence of obesity in a population of horses in the UK. Vet Rec. 2011;168: 1. doi:10.1136/vr.c6281

22. Christie J, Hewson C, Riley C, McNiven M, Dohoo I, Bate L. Management factors affecting stereotypies and body condition score in nonracing horses in Prince Edward Island. Can Vet J. 2006;47: 136- 143.

23. Honoré E, Uhlinger C. Equine feeding practices in central north carolina: a preliminary survey. J equine Vet Sci. 1994;14: 425- 429.

24. Ireland J, Clegg P, Mcgowan C, Mckane S, Chandler K, Pinchbeck G. Comparison of owner-reported health problems with veterinary assessment of geriatric horses in the United Kingdom. Equine Vet J. 2012;44: 94- 100. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00394.x

25. Robin C, Ireland J, Wylie C, Collins S, Verheyen K, Newton J. Prevalence of and risk factors for equine obesity in Great Britain based on owner-reported body condition scores. Equine Vet J. 2015;47: 196- 201. doi:10.1111/evj.12275

26. Visser E, Neijenhuis F, de Graaf-Roelfsema E, Wesselink H, de Boer J, van Wijhe-Kiezebrink M, et al. Risk factors associated with health disorders in sport and leisure horses in the Netherlands. J Anim Sci. 2014;92: 844- 855. doi:10.2527/jas.2013-6692

27. Jensen R, Danielsen S, Tauson A-H. The prevalence of obesity in mature Icelandic horses in Denmark. Acta Vet Scand. 2015;57: 2015. doi:10.1186/1751-0147-57-S1-O9

28. Morrison P, Harris P, Maltin C, Grove-white D, Argo C, Barfoot C. Perceptions of obesity in a UK leisure-based population of horse owners. Acta Vet Scand. 2015;57: 2015. doi:10.1186/1751-0147-57-S1-O6

29. Kuntz R, Kubalek C, Ruf T, Tataruch F, Arnold W, Ruf T, et al. Seasonal adjustment of energy budget in a large wild mammal, the Przewalski horse (Equus ferus przewalskii). J Exp Biol.

2006;209: 4566- 4573. doi:10.1016/S0737-0806(06)80118-8

30. Dawson M, Hone J. Demography and dynamics of three wild horse populations in the australian alps. Austral Ecol. 2012;37: 97- 109. doi:10.1111/j.1442-9993.2011.02247.x

31. Giles S, Nicol C, Rands S, Harris P. Assessing the seasonal prevalence and risk factors for nuchal crest adiposity in domestic horses and ponies using the Cresty Neck Score. BMC Vet Res. 2015;11: 13. doi:10.1186/s12917-015-0327-7

32. Hitchens P, Hultgren J, Frössling J, Emanuelson U, Keeling L. Prevalence and risk factors for overweight horses at premises in Sweden assessed using official animal welfare control data. Acta Vet Scand. BioMed Central; 2016;58: 61. doi:10.1186/s13028-016-0242-3

33. Giles S, Nicol C, Rands S, Harris P. Fat all year round - The welfare consequences of continuous equine obesity. Recent advances in animal welfare science - UFAW Animal Welfare Conference. Science in the Service of Animal Welfare; 2012. p. 33.

34. Bamford N, Potter S, Baskerville C, Harris P, Bailey S. Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in different equine breeds adapted to cereal-rich or fat-rich meals. Vet J. Elsevier Ltd; 2016;214: 14- 20. doi:10.1016/j.tvjl.2016.02.002

35. Frank N, Elliott S, Brandt L, Keisler D. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. J Am Vet Med Assoc. 2006;228: 1383- 90. doi:10.2460/javma.228.9.1383

36. Powell D, Reedy S, Sessions D, Fitzgerald B. Effect of short-term exercise training on insulin sensitivity in obese and lean mares. Equine Vet J. 2002;34: 81- 84. doi:10.1111/j.2042-3306.2002.tb05396.x

37. Jansson A, Stéfansdóttir G, Ragnarsson S. Plasma insulin concentration increases linearly with body condition in Icelandic horses. Acta Vet Scand. BioMed Central; 2016;58: 76.

doi:10.1186/s13028-016-0258-8

38. Hoffman R, Boston R, Stefanovski D, Kronfeld D, Harris P. Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. J Anim Sci. 2003;81: 2333- 2342.

39. Vick M, Adams A, Murphy B, Sessions D, Horohov D, Cook R, et al. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. J Anim Sci. 2007;85: 1144- 1155. doi:10.2527/jas.2006-673

40. Suagee J, Corl B, Crisman M, Pleasant R, Thatcher C, Geor R. Relationships between Body Condition Score and Plasma Inflammatory Cytokines, Insulin, and Lipids in a Mixed Population of Light-Breed Horses. J Vet Intern Med. 2013;27: 157- 163. doi:10.1111/jvim.12021

41. Frank N, Geor R, Bailey S, Durham A, Johnson P. Equine metabolic syndrome. J Vet Intern Med. 2010;19: 1- 13. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0392.x

42. Menzies-Gow N, Stevens K, Barr A, Camm I, Pfeiffer D, Marr C. Severity and outcome of equine pasture-associated laminitis managed in first opinion practice in the UK. Vet Rec. 2010;167: 364- 369. doi:10.1136/vr.c3206

43. Kearns C, Mckeever K, Kumagai K, Abe T. Fat-free mass is related to one-Mile race performance in elite standardbred horses. Vet J. 2002;163: 260- 266. doi:10.1053/tvjl.2001.0656

44. Lawrence L, Jackson S, Kline K, Moser L, Powell D, Biel M. Observations in body weight and condition of horses in a 150-mile endurance ride. Equine Vet Sci. 1992;12: 320- 324.

45. Fitzgerald BP, McManus CJ. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. Biol Reprod. Statistical Analysis Systems Institute, Inc., Cary, NC; 2000;63: 335- 340. doi:10.1095/biolreprod63.1.335

46. Morley S, Murray J-A. Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. J Equine Vet Sci. Elsevier Ltd; 2014;34: 842- 853.

doi:10.1016/j.jevs.2014.04.001

47. Kubiak J, Evans J, Potter G, Harms P, Jenkins W. Parturition in the multiparous mare fed to obesity. Equine Vet Sci. 1988;8: 135- 140.

48. Kubiak JRR, Evans JWW, Potter GDD, Harms PGG, Jenkins WLL. Milk yield composition in the multiparous mare fed to obesity. Equine Vet Sci. 1991;11: 158- 162. doi:10.1016/S0737-0806(07)80038-4

49. Martin-Rosset W. Nutrition et alimentation des chevaux : Nouvelles recommandations alimentaires de l'Inra. Versailles: Éditions Quæ; 2012.

50. Arnaud G, Baudoin N, Trillaud-Geyl C, Dubroeucq H, Martin-Rosset W, Micol D, et al. Notation de l'état corporel des cheaux de selle et de sport - Guide pratique. Institut de l'Elevage; 1997.

51. Bergman R. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. Diabetes. 1989. p. 1512- 1527. doi:10.2337/diab.38.12.1512

52. Robles M, Gautier C, Mendoza L, Peugnet P, Dubois C, Dahirel M, et al. Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years. PLoS One. 2017;12: e0169295. doi:10.1371/journal.pone.0169295

53. Bergman R, Phillips L, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man. Measurement of insulin sensitivity and β-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. J Clin Invest. 1981;68: 1456- 1467. doi:10.1172/JCI110398

54. Bergman R. Minimal model: perspective from 2005. Horm Res. 2005;64 Suppl 3: 8- 15. doi:10.1159/000089312

55. Boston R, Stefanovski D, Moate P, Sumner A, Watanabe R, Bergman R. MINMOD Millennium: a computer program to calculate glucose effectiveness and insulin sensitivity from the frequently

sampled intravenous glucose tolerance test. Diabetes Technol Ther. 2003;5: 1003-15. doi:10.1089/152091503322641060

56. Almeida J, Conley A, Mathewson L, Ball B. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. Reproduction. 2011;141: 841-848. doi:10.1530/REP-10-0499

57. Rode K, Sieme H, Richterich P, Brehm R. Characterization of the equine blood-testis barrier during tubular development in normal and cryptorchid stallions. Theriogenology. 2015;84: 763-772. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.009

58. Almeida J, Conley A, Mathewson L, Ball B. Expression of anti-M??llerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. Theriogenology. 2012;77: 847-857. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.09.007

59. Ball B. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. Anim Reprod Sci. 2008;107: 257-267. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.04.014

60. Vander Heyden L, Lejeune J-P, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, et al. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. Vet Rec. 2012;172: 68. doi:10.1136/vr.101034

61. Vander Heyden L, Lejeune J-P, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, et al. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. Vet Rec. 2013;172: 68 LP-68. Consulté: http://veterinaryrecord.bmj.com/content/172/3/68.abstract

62. van Weeren P. Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). Clin Tech Equine Pract. 2006;5: 248-258. doi:10.1053/j.ctep.2006.08.002

63. Denoix J. Sémiologie radiographique générale des articulations. Prat Vétérinaire Equine. 1990;22: 14-27.

64. Fox J, Weisberg S. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Sage; 2011.

65. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Core Team R. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. [Internet]. R package version 2.1-131. 2017. Consulté: https://cran.r-project.org/package=nlme

66. Lenth R V. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. J Stat Softw. 2016;69: 1-33. doi:10.18637/jss.v069.i01

67. Lê S, Josse J, Husson F. **FactoMineR** : An *R* Package for Multivariate Analysis. J Stat Softw. 2008;25: 1-18. doi:10.18637/jss.v025.i01

68. Gentry L, Thompson D, Gentry G, Davis K, Godke R, Cartmill J. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. J Anim Sci. 2002;80: 2695-2703. doi:10.1016/S0093-691X(02)00841-5

69. Kearns C, McKeever K, Roegner V, Brady S, Malinowski K. Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. Vet J. 2006;172: 460-465. doi:10.1016/j.tvjl.2005.05.002

70. Buff P, Dodds A, Morrison C, Whitley N, McFadin E, Daniel J, et al. Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. J Anim Sci. 2002;80: 2942-2948. doi:/2002.80112942x

71. Bamford NJ, Potter SJ, Harris PA, Bailey SR. Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in horses and ponies fed a high fat diet, with or without a once daily high glycaemic meal. Equine Vet J. 2015;48: 368-373. doi:10.1111/evj.12434

72. Cartmill J, Thompson D, Storer W, Gentry L, Huff N. Endocrine responses in mares and geldings with high body condition scores grouped by high vs. low resting leptin concentrations. Am Soc Anim Sci. 2003;81: 2311-2321.

73. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ. Involvement of AMP-

activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. Diabetes. 2003;52: 1355-1363. doi:10.2337/diabetes.52.6.1355

74. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med. Nature Publishing Group; 2002;8: 1288-1295. doi:10.1038/nm788

75. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood. 2000;96: 1723-1732.

76. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004;323: 630-635. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.145

77. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, et al. Adiponectin induces TNF-a and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. Biochem Biophys Res Commun. 2005;335: 1254-1263. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.197

78. Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. Diabetes. 2003;52: 942-7. Consulté: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663465

79. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. Circulation. 2003;107: 671-4. Consulté: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578865

80. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets [Internet]. Nutrients. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2013. p. 1218-1240.

doi:10.3390/nu5041218

81. Smith S, Marr C, Dunnett C, Menzies-Gow N. The effect of obesity and endocrine function on foal birthweight in Thoroughbred mares. Equine Vet J. 2016;49: 461-466. doi:10.1111/evj.12645

82. Pleasant R, Suagee J, Thatcher C, Elvinger F, Geor R. Adiposity, plasma insulin, leptin, lipids, and oxidative stress in mature light breed horses. J Vet Intern Med. 2013;27: 576-582. doi:10.1111/jvim.12056

83. Barber T, Viña JR, Viña J, Cabo J. Decreased urea synthesis in cafeteria-diet-induced obesity in the rat. Biochem J. Portland Press Ltd; 1985;230: 675-681. Consulté: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4062872

84. He Q, Ren P, Kong X, Wu Y, Wu G, Li P, et al. Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR-based metabonomic approach. J Nutr Biochem. 2012;23: 133-139. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.11.007

85. Wijekoon EP, Skinner C, Brosnan ME, Brosnan JT. Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. Can J Physiol Pharmacol. 2004;82: 506-514. doi:10.1139/y04-067

86. Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Pre-Weaning Horses. Cameron EZ, éditeur. PLoS One. Public Library of Science; 2014;9: e102044. doi:10.1371/journal.pone.0102044

87. Irvine CH, Evans MJ. Postnatal changes in total and free thyroxine and triiodothyronine in foal serum. J Reprod Fertil Suppl. 1975; 709-15. Consulté: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060870

88. Malinowski K, Christensen R, Hafs H, Scanes C. Age and breed differences in thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins in female horses. J Anim Sci. 1996;74: 1936. doi:10.2527/1996.7481936x

89. Murray M, Luba N. Plasma gastrin and somatostatin, and serum thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), reverse triiodothyronine (rT3) and cortisol concentrations in foals from birth to 28 days of age. Equine Vet J. Blackwell Publishing Ltd; 1993;25: 237-239. doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb02951.x

90. Furr M, Murray M, Ferguson D. The effects of stress on gastric ulceration, T3, T4, reverse T3 and Cortisol in neonatal foals. Equine Vet J. Blackwell Publishing Ltd; 1992;24: 37-40. doi:10.1111/j.2042-3306.1992.tb02776.x

91. Rossdale PD. A clinician's view of prematurity and dysmaturity in thoroughbred foals. Proc R Soc Med. Royal Society of Medicine Press; 1976;69: 631-2. Consulté: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/981260

92. Frank N, Sojka JE, Patterson BW, Wood K V., Bonham CC, Latour MA. Effect of hypothyroidism on kinetics of metabolism of very-low-density lipoprotein in mares. Am J Vet Res. 2003;64: 1052-1058. doi:10.2460/ajvr.2003.64.1052

93. Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function [Internet]. Journal of Endocrinology. BioScientifica; 2008. p. 351-365. doi:10.1677/JOE-08-0218

94. Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, et al. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. Mol Endocrinol. Oxford University Press; 2013;27: 814-27. doi:10.1210/me.2012-1258

95. Cymbaluk N, Laarveld B. The ontogeny of serum insulin-like growth factor-I concentration in

foals: effects of dam parity, diet, and age at weaning. Domest Anim Endocrinol. 1996;13: 197-209. doi:0739724096000148 [pii]

96. Kedzierski W, Kusy R, Kowalik S. Plasma leptin level in hyperlipidemic mares and their newborn foals. Reprod Domest Anim. 2011;46: 275-280. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01658.x

97. Cavinder C, Burns S, Coverdale J, Hammer C, Holub G, Hinrichs K. Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. Prof Anim Sci. Elsevier Masson SAS; 2012;28: 344-350. doi:10.15232/S1080-7446(15)30366-1

98. Bilbo S, Tsang V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology; 2010;24: 2104-2115. doi:10.1096/fj.09-144014

99. Deardorff J, Smith LH, Petito L, Kim H, Abrams BF. Maternal Prepregnancy Weight and Children's Behavioral and Emotional Outcomes. Am J Prev Med. 2017;In press. doi:10.1016/j.amepre.2017.05.013

100. Peugnet P, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, et al. Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre- weaning horses. PLoS One. 2015;10: e0122596. doi:10.1371/journal.pone.0122596

101. Mendoza L, Lejeune J-P, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Deliège B, et al. Impact of feeding and housing on the development of osteochondrosis in foals — A longitudinal study. Prev Vet Med. Elsevier B.V.; 2016;127: 10-14. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.03.003

102. Ralston S. Postprandial hyperglycemica/hyperinsulinemia in young horses with osteochondritis dissecans lesions. Pferdeheilkunde. 1996; 320-322.

103. Pagan JD, Geor RJ, Caddel SE, Pryor PB, Hoekstra KE. The Relationship Between Glycemic Response and the Incidence of OCD in Thoroughbred Weanlings: A Field Study. Proceedings of

the 47th AAEP Annual Convention. 2001. p. 322-325. Consulté: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.459.5459&rep=rep1&type=pdf

104. Fulzele K, Riddle R, DiGirolamo D, Cao X, Wan C, Chen D, et al. Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. Cell. 2010;142: 309-319. doi:10.1016/j.cell.2010.06.002

105. Yang J, Zhang X, Wang W, Liu J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. Cell Biochem Funct. 2010;28: 334-341. doi:10.1002/cbf.1668

106. Pramojanee S, Phimphilai M, Kumphune S, Chattipakorn N, Chattipakorn S. Decreased Jaw Bone Density and Osteoblastic Insulin Signaling in a Model of Obesity. J Dent Res. 2013;92: 560-565. doi:10.1177/0022034513485600

107. Pramojanee S, Phimphilai M, Chattipakorn N, Chattipakorn S. Possible roles of insulin signaling in osteoblasts. Endocr Res. 2014;39: 144-51. doi:10.3109/07435800.2013.879168

108. Phornphutkul C, Wu K, Gruppuso P. The role of insulin in chondrogenesis. Mol Cell Endocrinol. Elsevier Ireland Ltd; 2006;249: 107-115. doi:10.1016/j.mce.2006.02.002

109. Henson F, Davenport C, Butler L, Moran I, Shingleton W, Jeffcott L, et al. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. Equine Vet J. 1997;29: 441-447.

110. Maor G, Silbermann M, von der Mark K, Heingard D, Laron Z. Insulin enhances the growth of cartilage in organ and tissue cultures of mouse neonatal mandibular condyle. Calcif Tissue Int. 1993;52: 291-299. doi:10.1007/BF00296654

111. Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Higuchi C, Hirao M, Okamoto M, et al. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. J Bone

Miner Metab. Springer Japan; 2014;32: 378-392. doi:10.1007/s00774-013-0514-1

112. Hughes C, Xie M, Mccoski S, Ealy A. Domestic Animal Endocrinology Activities for leptin in bovine trophoblast cells. Domest Anim Endocrinol. Elsevier Inc; 2017;58: 84-89. doi:10.1016/j.domaniend.2016.09.001

113. Mera P, Laue K, Ferron M, Confavreux C, Wei J, Galan-Diez M, et al. Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. Cell Metab. 2016;23: 1078-1092. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.004

114. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-α signaling in macrophages. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. NIH Public Access; 2010;20: 87-103. Consulté: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21133840

115. Serteyn D, Piquemal D, Vanderheyden L, Lejeune JP, Verwilghen D, Sandersen C. Gene expression profiling from leukocytes of horses affected by osteochondrosis. J Orthop Res. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2010;28: 965-970. doi:10.1002/jor.21089

Supporting information

S1 Table. Nutritional information of pregnant mares. A. Daily nutritional supply ingested by pregnant mares during wintering (from 6 months of gestation to foaling) (median and [Q1-Q3]). B. Quality of feedstuff from the INRA system given to pregnant mares during wintering (from 6 months of gestation to foaling). HFU: Horse feed unit (net energy, 1 HFU = 2250 kcal), HDCP: Horse digestible crude protein, RC: Raw cellulose, P: Phosphorus, Ca: Calcium.

S2 Table. Nutritional information of growing foals. A. Daily nutritional supply ingested by growing foals during wintering (from 6 to 12 months of age) (median and [Q1-Q3]). B. Quality of feedstuff from the INRA system given to pregnant mares during wintering (from 6 to 12 months of age). HFU: Horse

feed unit (net energy, 1 HFU = 2250 kcal), HDCP : Horse digestible crude protein, RC: Raw cellulose, P: Phosphorus, Ca: Calcium.

S3 Table. Composition of the vitamin and minerals complement given to foals and yearlings in pasture.

S4 Fig. Validations of leptin assay. A. Dilutional parallelism between standard curve and endogenous leptin. To linearize the 4PL curve, logit was calculated as logit = log ((AlphaLISA signal (count) – minimum asymptote) / (maximum asymptote – AlphaLISA signal (count))). B. Expected leptin values against obtained values. Linear regression statistic test was applied to compare the equality of slope to 1 and intercepts to 0. Run-test was performed to determine whether data deviated significantly from the linear model. For both tests and for all samples, $p<0.5$. C. Bland-Altman graph comparing the expected leptin values against the obtained values.

S5 Fig. Validations of adiponectin assay. A. Dilutional parallelism between standard curve and endogenous adiponectin. To linearize the 4PL curve, logit was calculated as logit = log ((AlphaLISA signal (count) – minimum asymptote) / (maximum asymptote – AlphaLISA signal (count))). B. Expected adiponectin values against obtained values. Linear regression statistic test was applied to compare the equality of slope to 1 and intercepts to 0. Run-test was performed to determine whether data deviated significantly from the linear model. For both tests and for all samples, $p<0.5$. C. Bland-Altman graph comparing the expected adiponectin values against the obtained values.

S6 Fig. Principal component analysis of expression of genes involved in testicular maturity (*Cyp19*, *Connexin 43* (*Cx43*), *Androgen Receptor* (*AR*), *Steroidogenic Acute Regulatory Protein* (*STAR*)), testicular immaturity (*Anti-Müllerian hormone* (*AMH*)) and genes involved in the establishment of the blood-testis barrier (*Occludin and N Cadherin*). A. Graph of variables. B. Graph of individuals. There was no difference between groups.

S7 File. Weather report edited by Météo-France for the months of July and August when broodmares were in lactation in pastures.

Figure 1

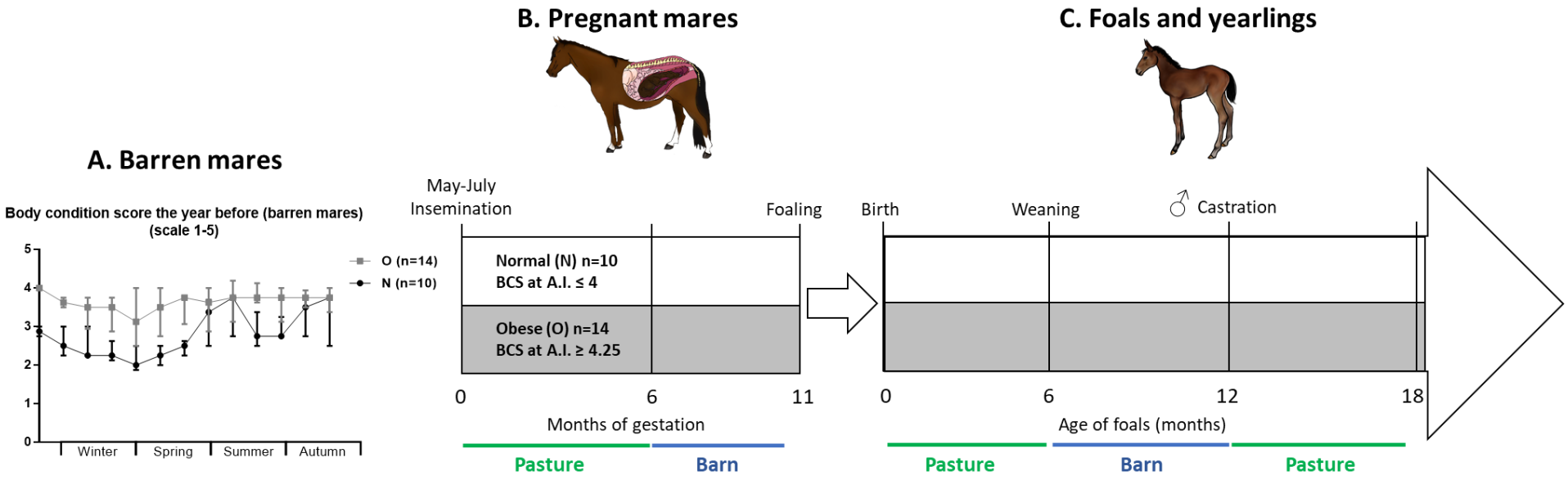

A. Barren mares
Body condition score the year before (barren mares)
(scale 1-5)
O (n=14)
N (n=10)
Winter
Spring
Summer
Autumn
B. Pregnant mares
May-July
Insemination
Foaling
Normal (N) n=10
BCS at A.I. ≤ 4
Obese (O) n=14
BCS at A.I. ≥ 4.25
Months of gestation
Pasture
Barn
C. Foals and yearlings
Birth
Weaning
Castration
Age of foals (months)
Pasture
Barn
Pasture

Figure 2

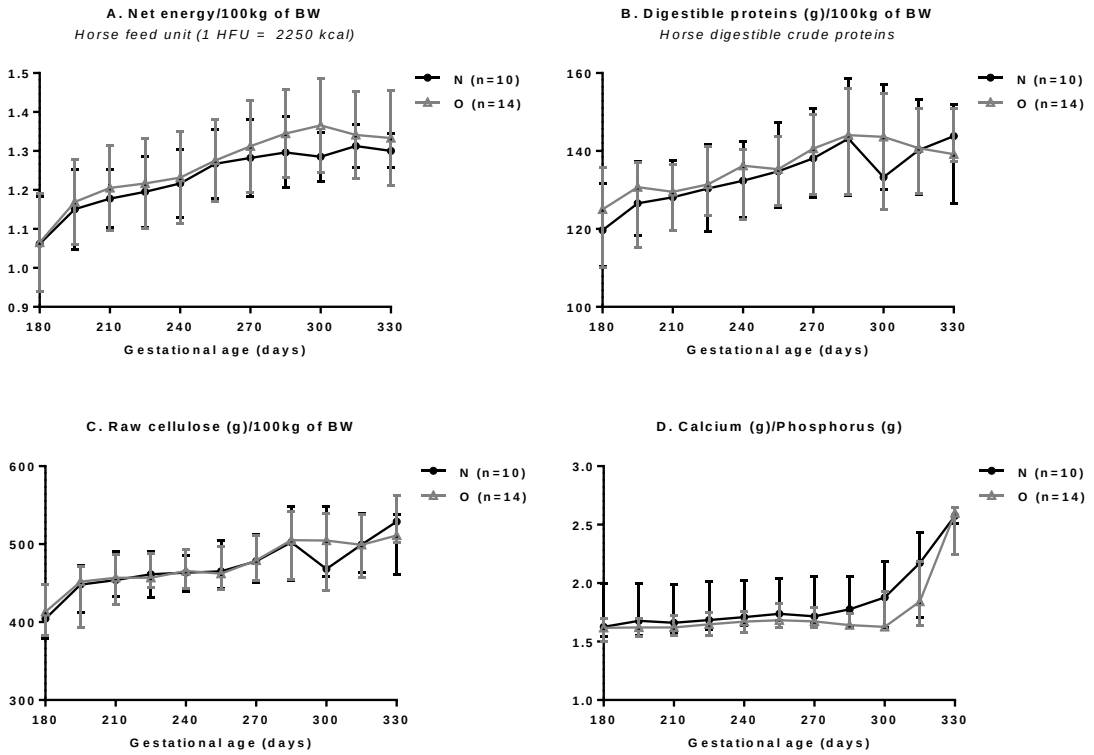


Figure 3

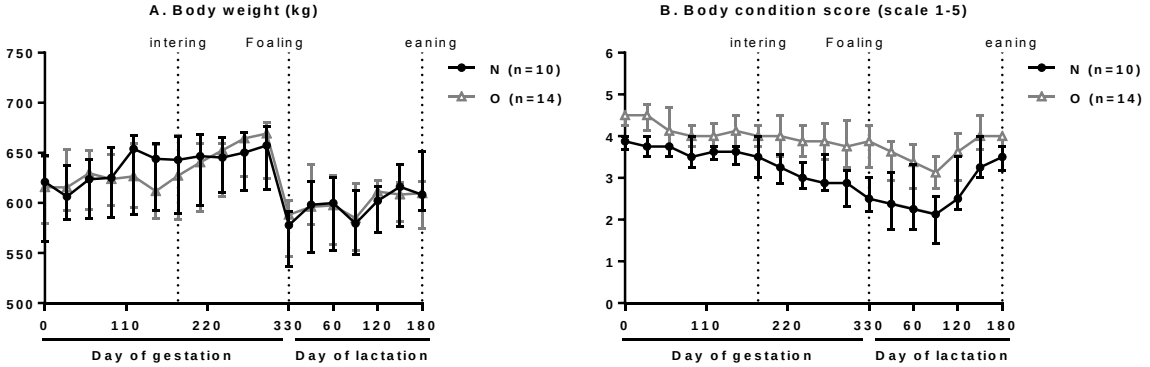


Figure 4

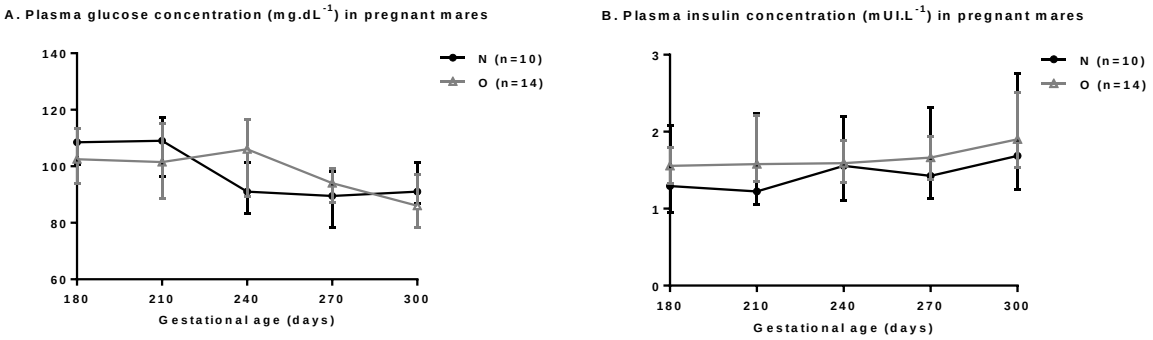


Figure 5

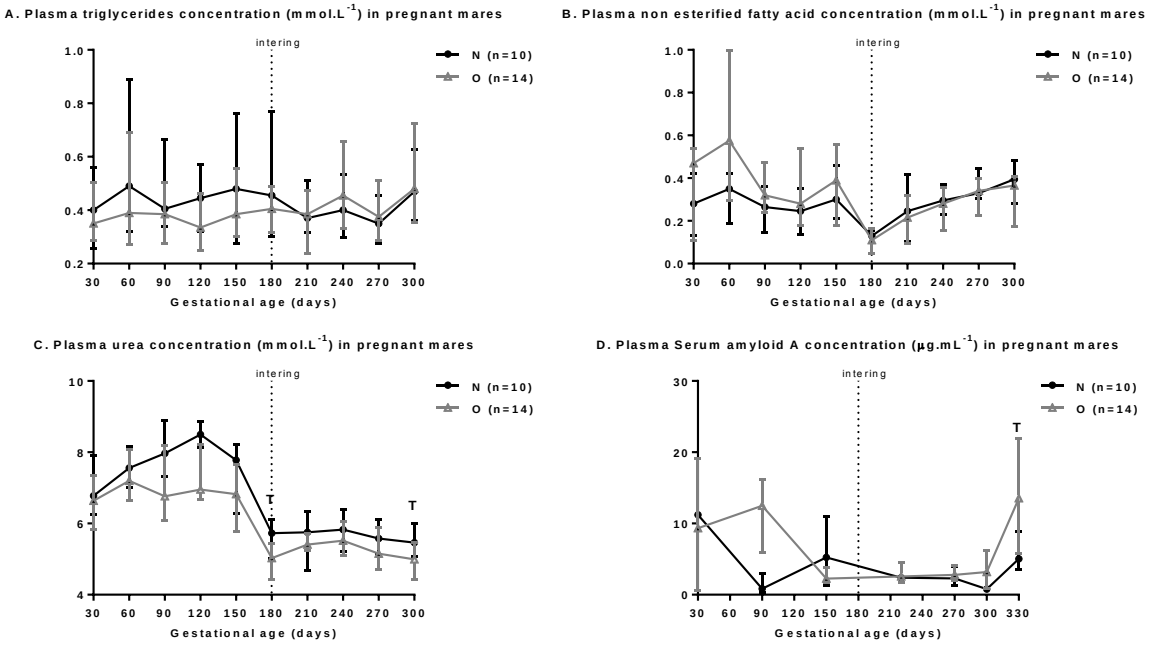


Figure 6

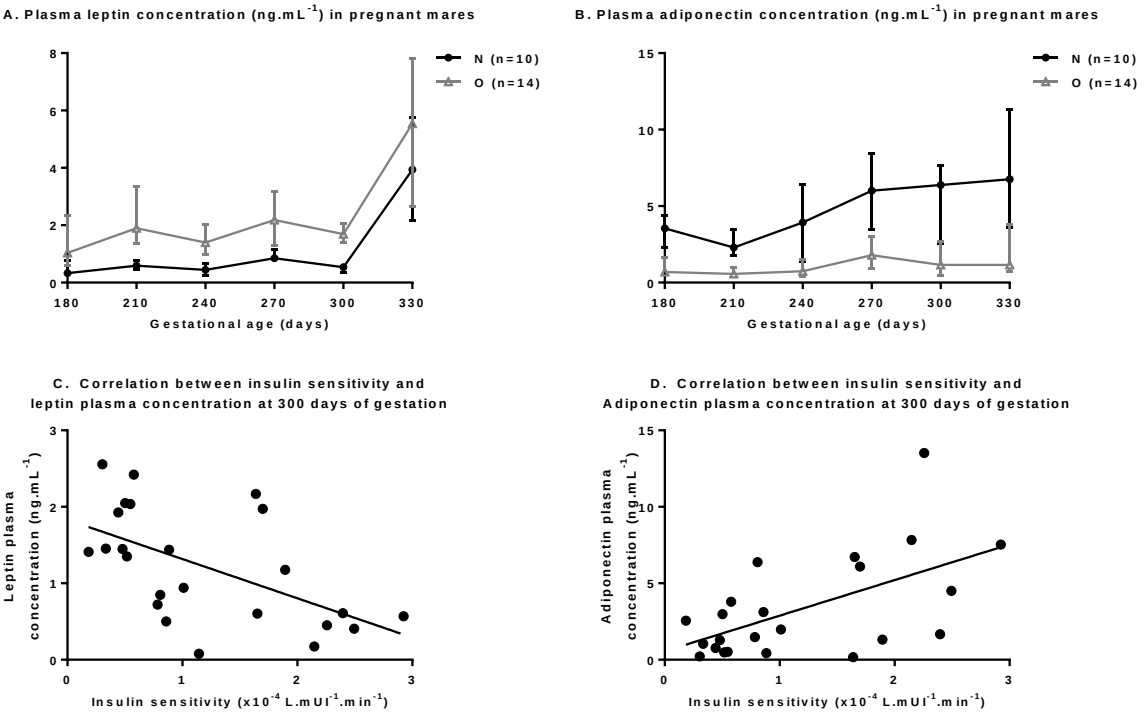


Figure 7

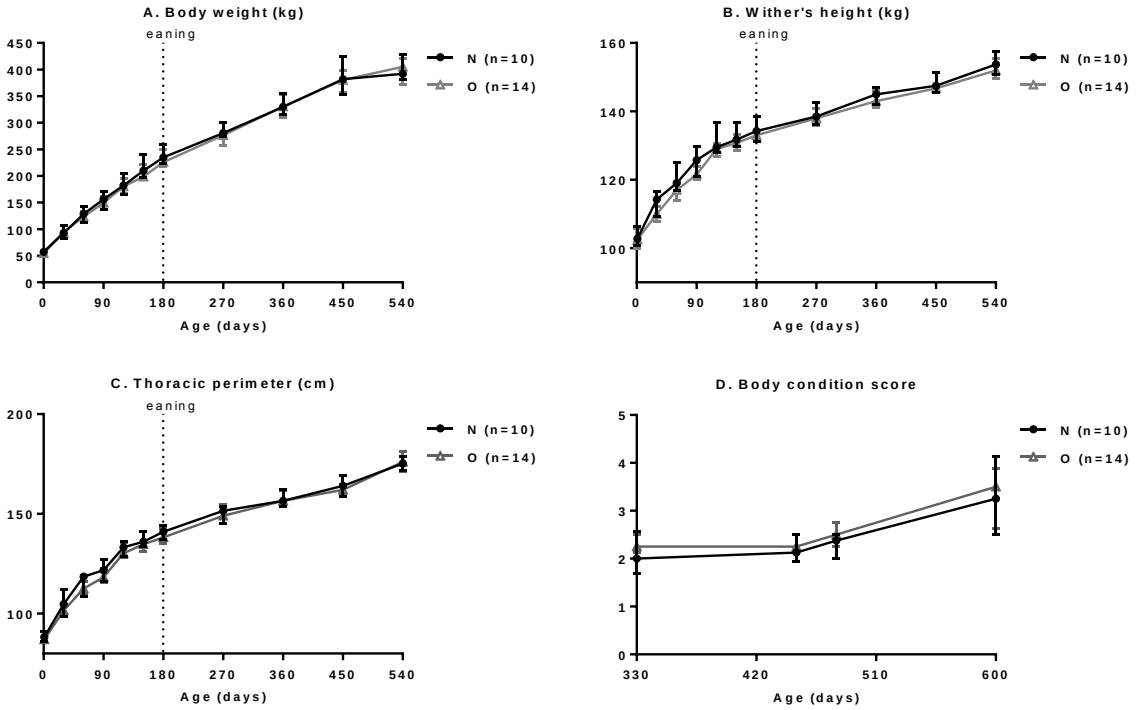


Figure 8

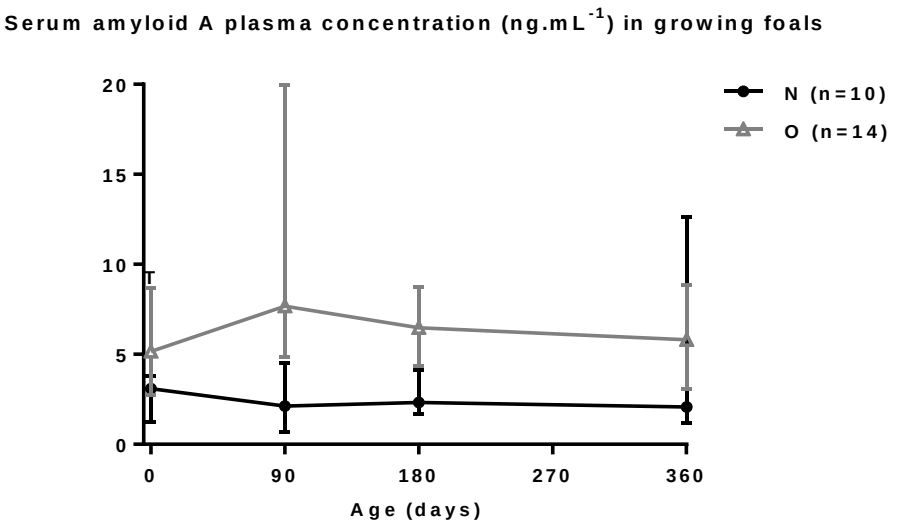
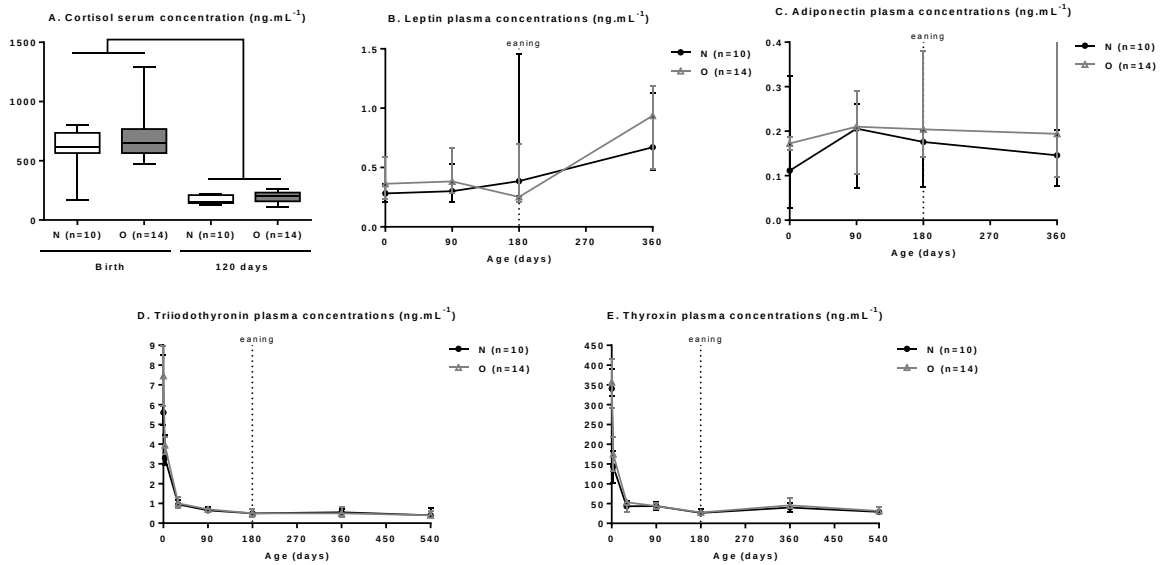


Figure 9



Supplementary Table 1

A	Hay (kg of dry matter)					Haylage (kg of dry matter)					Concentrate (kg of dry matter)				
Month of gestation	170	174	240	270	300	180	210	240	270	300	180	210	240	270	300
Group Normal (n=10)	5.3 [5.2-5.3]	5.3 [5.2-5.3]	5.2 [5.0-5.3]	5.3 [5.3-5.6]	5.8 [5.6-6.0]	2.8 [2.8-2.8]	3.6 [3.6-3.6]	3.9 [3.9-3.9]	4.1 [4.1-4.1]	4.3 [4.3-4.3]	2.1 [2.1-2.1]	2.1 [2.1-2.1]	2.4 [2.4-2.4]	2.6 [2.6-2.6]	2.6 [2.6-2.6]
Group Obese (n=14)	5.3 [5.2-5.3]	5.3 5.2-5.3]	5.2 [5.1-5.2]	5.6 [5.5-5.7]	5.9 [5.7-6.1]	2.8 [2.8-2.8]	3.6 [3.6-3.6]	3.9 [3.9-3.9]	4.0 [4.0-4.0]	4.2 [4.2-4.2]	2.6 [2.6-2.6]	2.6 [2.6-2.6]	2.9 [2.9-2.9]	3.0 [3.0-3.0]	3.0 [3.0-3.0]

B	Hay					Haylage 1 (used until the 30th of April)					Haylage 2 (Used from the 1st of May)					Concentrate				
	HFU	HDCP (g)	RC (g)	P (g)	Ca (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)	P (g)	Ca (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)	P (g)	Ca (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)	P (g)	Ca (g)
	0.86	72.0	364.3	1.7	3.2	0.6	44.0	276.0	3.4	4.9	0.6	45.6	302.6	0.9	1.5	1.1	93.5	53.0	5.3	11.0

Supplementary Table 2

A	Hay (kg of dry matter)	Concentrate (kg of dry matter)
Until 11 months of age	5.0	1.6
Between 11 and 12 months of age	4.3	2.7

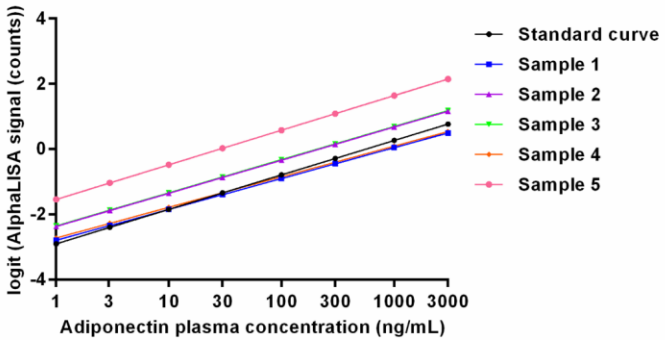
B	Hay					Concentrate				
	HFU	HDCP (g)	RC (g)	P (g)	Ca (g)	HFU	HDCP (g)	RC (g)	P (g)	Ca (g)
	0.6	72	364.3	1.73	3.2	1.1	102	63.9	4.9	7.1

Supplementary Table 3

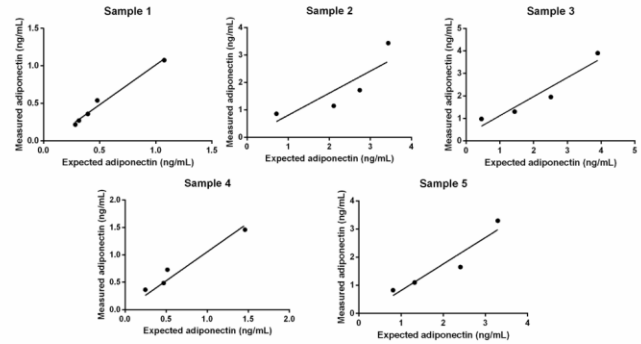
Composition	Calcium carbonate, monocalcium phosphate, magnesium oxide, lithothamne, cane molasses, sodium chloride, magnesium phosphate, plants
Vitamins / kg of brute matter	
Vitamin A	300 000 IU
Vitamin D3	90 000 IU
Vitamin E	1000 IU
Micronutrients / kg of brute matter	
Copper sulfate pentahydrate	570 mg
Copper chelate of glycine hydrate	30 mg
Zinc oxide	3560 mg
Zinc chelate of glycine hydrate	190 mg
Manganese oxide	3000 mg
Anhydrous calcium iodate	55 mg
Cobalt basic carbonate monohydrate	25 mg
Sodium selenite	18 mg

Supplementary Figure 4

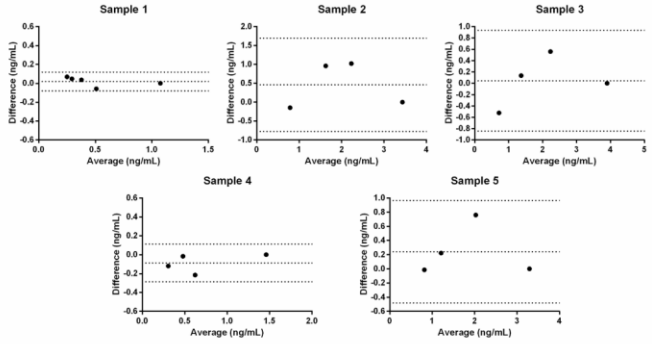
A. Dilutional parallelism between standard curve and endogenous adiponectin



B. Expected adiponectin values against obtained values

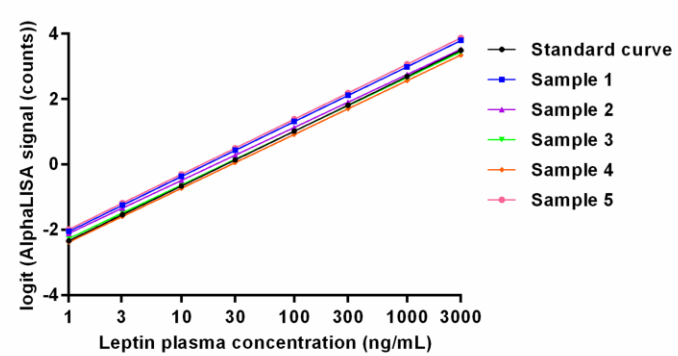


C. Bland-altman graph comparing the expected adiponectin values against the obtained values

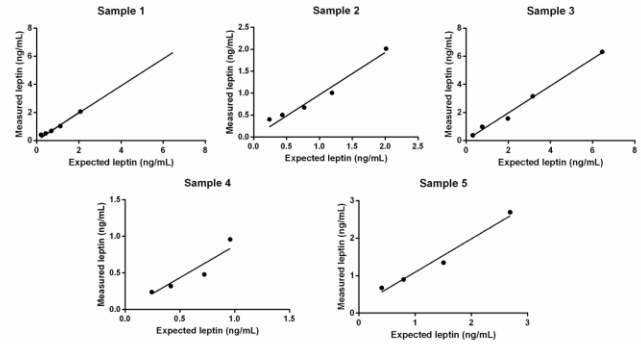


Supplementary Figure 5

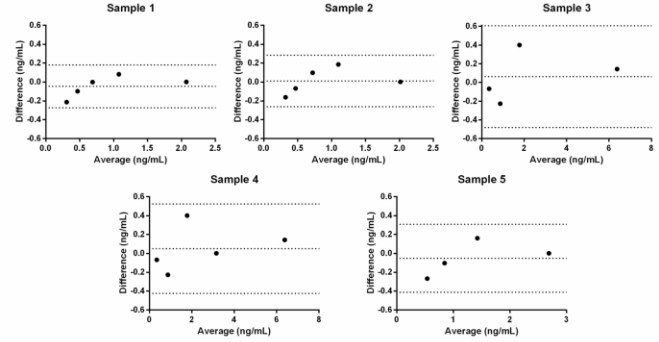
A. Dilutional parallelism between standard curve and endogenous leptin



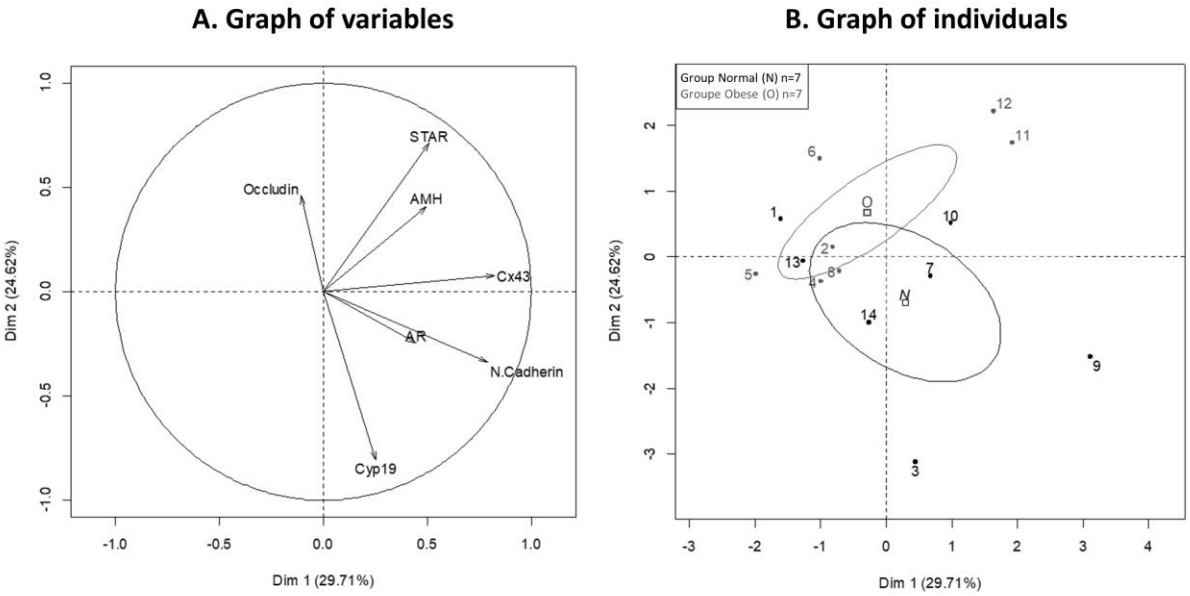
B. Expected leptin values against obtained values



C. Bland-altman graph comparing the expected leptin values against the obtained values



Supplementary Figure 6



Supplementary File 7

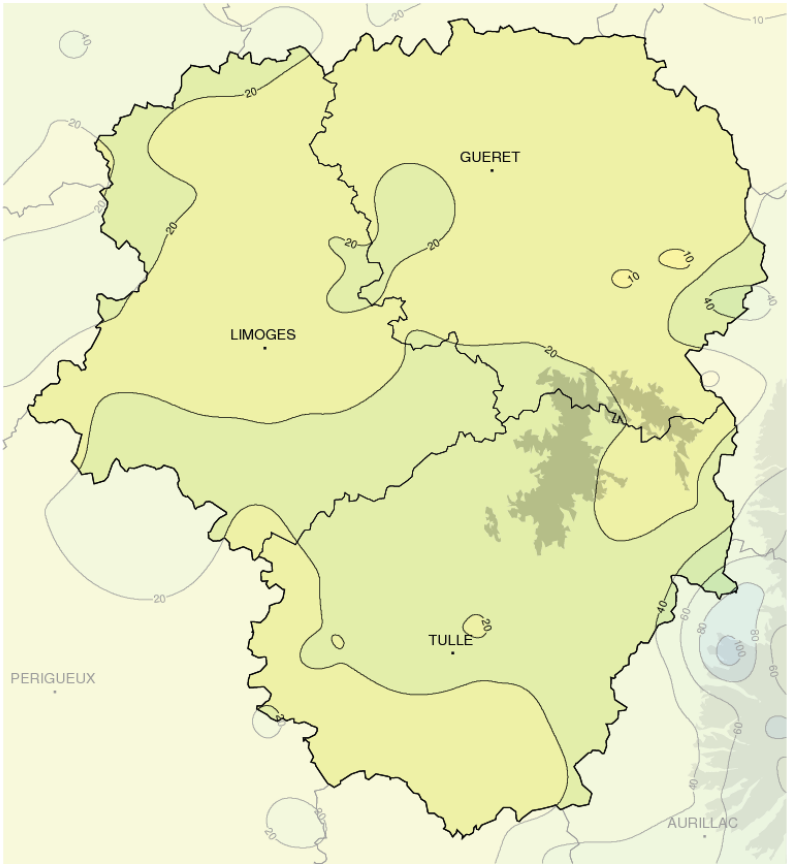
Bulletin climatique

Limousin

Juillet 2015

Exceptionnellement sec, très chaud

Précipitations mensuelles (mm)



Caractère dominant du mois
Il est très chaud, sec et bien ensoleillé

Précipitations
Elles sont très faibles et déficitaires sur l'ensemble de la région, ce déficit atteignant 50 à 88% par rapport aux normales.

Températures
Les moyennes sont chaudes, supérieures aux normales de 2 à 4°C, avec une première partie de mois très chaude voire caniculaire par moments.

Ensoleillement
Il est assez généreux et supérieur là aussi aux normales de 12 à 20%.

Faits marquants

Sécheresse remarquable

Ce mois de Juillet est très sec . Il se classe au 1er rang des mois de Juillet les plus secs depuis 1973 à Limoges Bellegarde et à Brive depuis 1988. A Guéret ce mois de Juillet est au 3ème rang depuis 1976, avec seulement 2 mm de plus que le mois le plus sec. En outre, le nombre de jours avec précipitations supérieures à 1 mm est de seulement 4 alors que la normale est de 9.
Ce temps sec vient aggraver fortement l'état de sécheresse amorcé depuis le mois d'avril en Limousin.

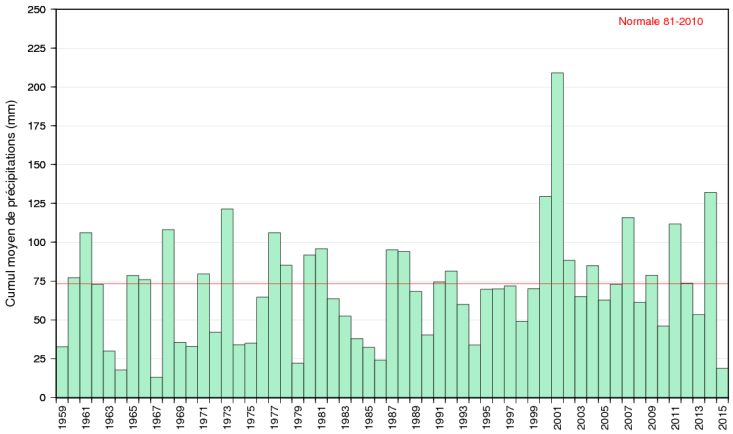
Un 16 Juillet record

Le 16 Juillet restera dans les annales. En effet de nombreux records absolus de température maximale ont été battus ce jour là. C'est le cas à Brive avec 41.4°C, à Limoges ville avec 40°C, à Boussac (23) avec 38.9°C entre autres pour ne citer que les valeurs les plus hautes de chaque département. Il faut également noter le nombre de jours très chauds (maximales supérieures à 30°C) enregistré, qui est de 9 à Limoges alors que la normale pour un mois de Juillet est seulement de 3 jours.

Précipitations

Très sec

Les précipitations sont très nettement déficitaires, il s'agit quasiment partout du mois de Juillet le plus sec de ces trente dernières années. Le mois commence avec des pluies très faibles du 1er au 4 (de 1 à 4 mm en cumul) puis après un léger passage pluvieux le 7 (0 à 3 mm), il faut attendre le 16 pour voir quelques averses orageuses se produire en Corrèze. Le temps est à nouveau instable le 18, mais seuls la Corrèze et le Sud-Est de la Creuse sont touchés. Les 21 et 22 des averses se produisent à nouveau de façon isolée donnant jusqu'à 13 mm à Bénévent(23). Du 24 au 27, il pleut très faiblement chaque jour, puis les 28 et 29 les pluies sont plus marquées (jusqu'à 17 mm à Surdoux(87)). Le 31 il pleut à nouveau faiblement.

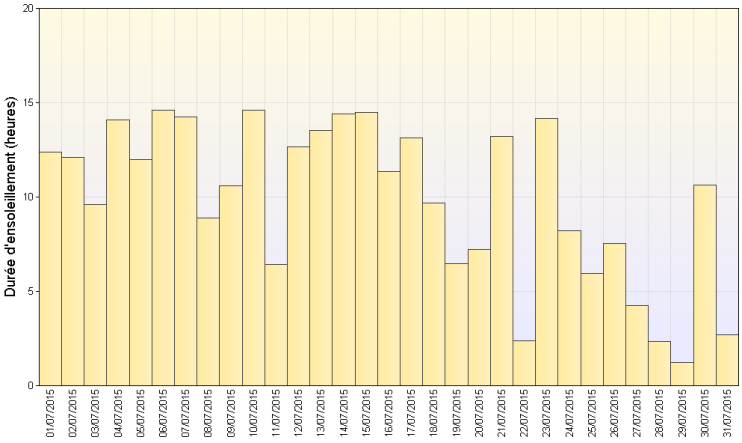


Cumul mensuel de précipitations depuis 1959 sur la région Limousin

Ensoleillement

Soleil généreux

Le soleil est bien présent mais pas autant que le laissent à penser les températures élevées. Il brille durant 305 h à Brive (+19% par rapport à la normale) et 269 h à Limoges (+13% par rapport à la normale). L'ensoleillement est de 277 h à Naves (19), 285 h à Saint-Yrieix(87) et 286 h à Guéret et Bourganeuf(23).



Ensoleillement quotidien à Brive (19)

Vents

Sud-Ouest dominant

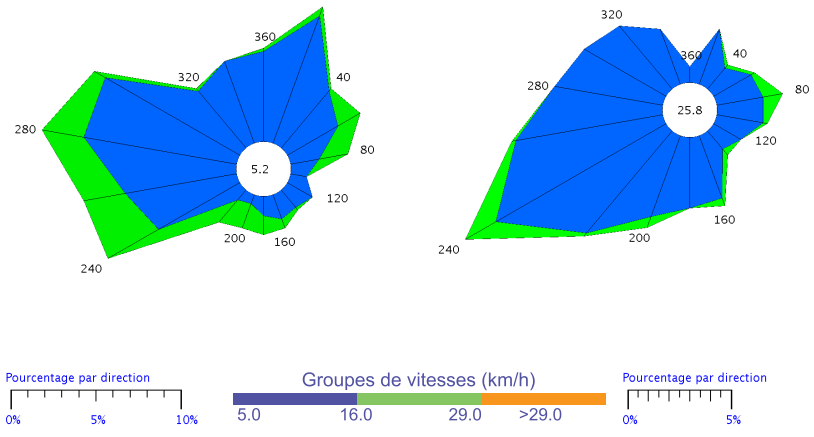
Le vent est faible à modéré de Sud-Ouest à Ouest dominant. Il s'oriente toutefois par moments au Nord-Est.

Rafales maximales enregistrées:

Le 19:
Ussel (19) 61 km/h
Nespouls (19) 60 km/h

Le 24
Peyrelevade (19) 60 km/h
Magnac-Laval (87) 59 km/h

Le 26
Felletin (23) 58 km/h

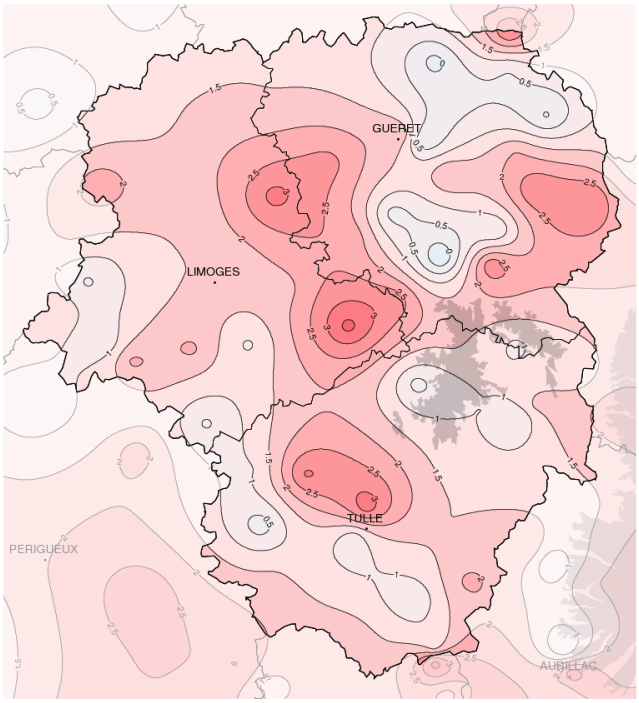


Limoges (87) *La Souterraine (23)*

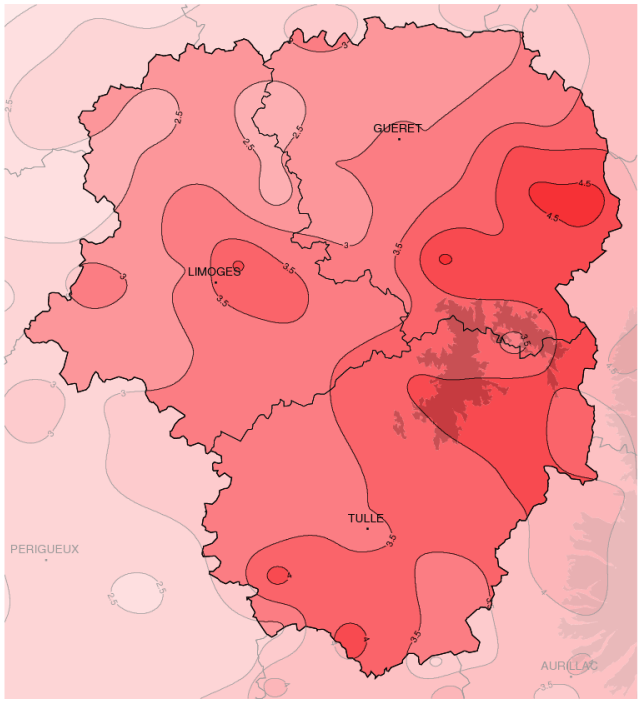
Rose des vents

METEO FRANCE
Toujours un temps d'avance

Températures



Températures minimales (°C)

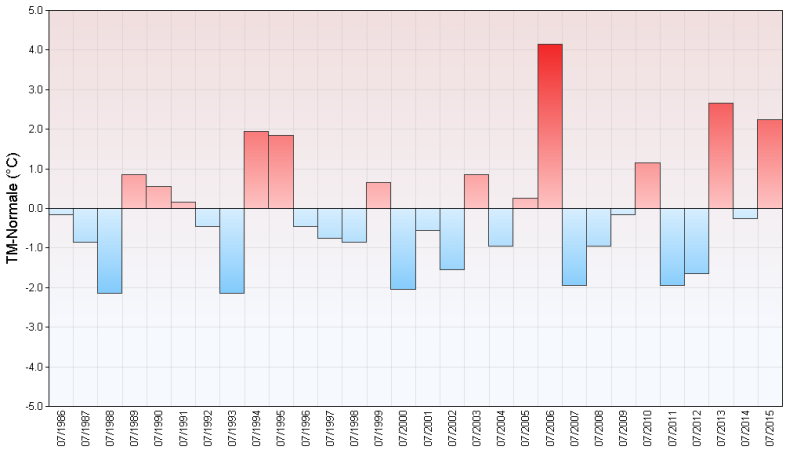


Températures maximales (°C)

Ecart à la normale mensuelle (*)

Première quinzaine très chaude

La canicule démarrée fin Juin se poursuit début Juillet avec des minimales et des maximales nettement au-dessus des normales. Localement le 3 les maximales battent des records, elles atteignent ou dépassent les 33°C sur l'ensemble du Limousin. Il fait même 40°C à Brive, 39°C à Argentat(19), 38°C à Limoges ville, Saint-Loup et Auzances(23). A partir du 4 les températures nocturnes fléchissent légèrement mais les températures maximales restent élevées. Elles sont moins fortes toutefois avec un passage en-dessous des normales le 8. Le 10 nous connaissons un nouveau pic de chaleur avec 30 à 37°C sur la région. Les jours suivant il fait moins chaud puis les 15 et 16 les maximales repartent à la hausse. Elles atteignent leur apogée le 16 où les records absolus de températures sont battus quasiment sur l'ensemble de la région. Il fait 41°C à Brive, Argentat et Branceilles(19) et 40°C à Limoges ville et Saint-Loup et plus de 35°C sur tout le Limousin. La chaleur est moins marquée les jours suivant malgré une nouvelle poussée du mercure le 21. A partir du 22, les températures baissent et repassent en-dessous des normales. La journée la plus fraîche est le 29 avec des maximales ne dépassant pas les 23°C. Le lendemain matin l'atmosphère est très fraiche, avec seulement 2 à 3°C sur le Millevaches. Le mois se termine avec des températures qui restent en-dessous des normales.



Ecart à la normale mensuelle (*) des températures moyennes mensuelles pour les 30 dernières années à Limoges (87)

(*) Période de référence 1981/2010

METEO FRANCE
Toujours un temps d'avance

Résumé mensuel

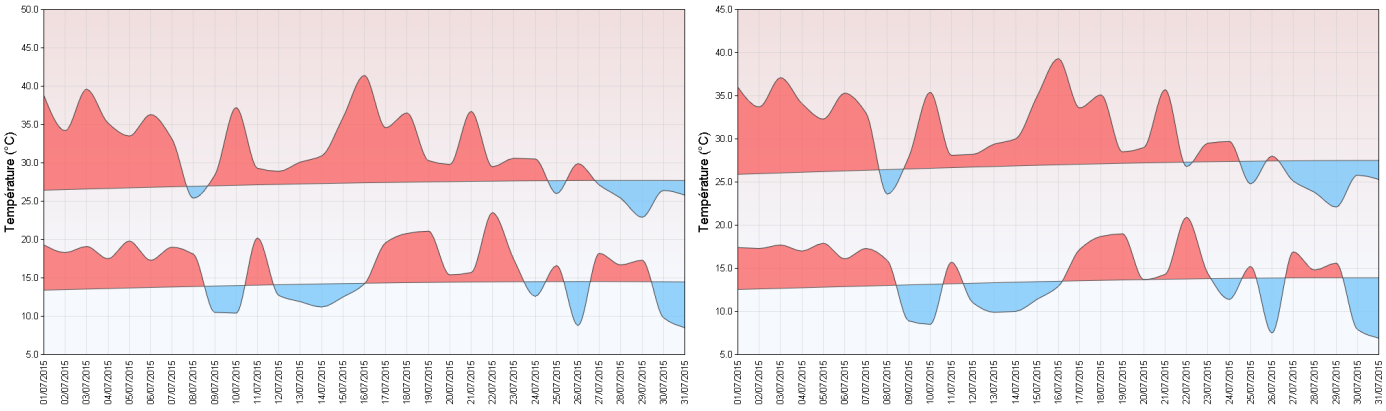
Du 1er au 24: Très chaud avec de rares orages

Le mois débute dans un flux de Sud et une chaleur étouffante et même des températures caniculaires du 1er au 3 sur Creuse et Haute-Vienne et jusqu'au 4 sur la Corrèze. Le 3 les températures maximales flirtent avec les 40°C dans le Sud de la Corrèze avec 39.6°C à Brive et 39°C Argentat. Le 4, il fait très chaud le matin puis en marge d'une perturbation quelques averses orageuses se produisent. Le 5, à l'arrière des averses orageuses le temps est un peu moins chaud mais ensoleillé; les 6 et 7 le mercure dépasse à nouveau 30°C sur l'ensemble de la région. Après un passage faiblement perturbé dans la nuit, le 8 le temps est plus frais. Les 9 et 10 voient l'atmosphère se réchauffer sous un ciel de moins en moins nuageux. Le 11 en début de journée le ciel couvert laisse échapper de très faibles bruines, mais en cours de journée le ciel se dégage. Du 12 au 14 Juillet il fait moins chaud sous un ciel voilé à couvert. Le ciel se dégage le 15 et le mercure remonte, le 16 est caniculaire sous un soleil de plomb avec des maximales record et quelques averses orageuses. Les 17 et 18 restent très chauds et encore localement instables avec des orages plus marqués le 18 sur le Sud de la région. Le temps devient moins chaud les jours suivants et du 19 au 24 des averses orageuses isolées se produisent par endroits.

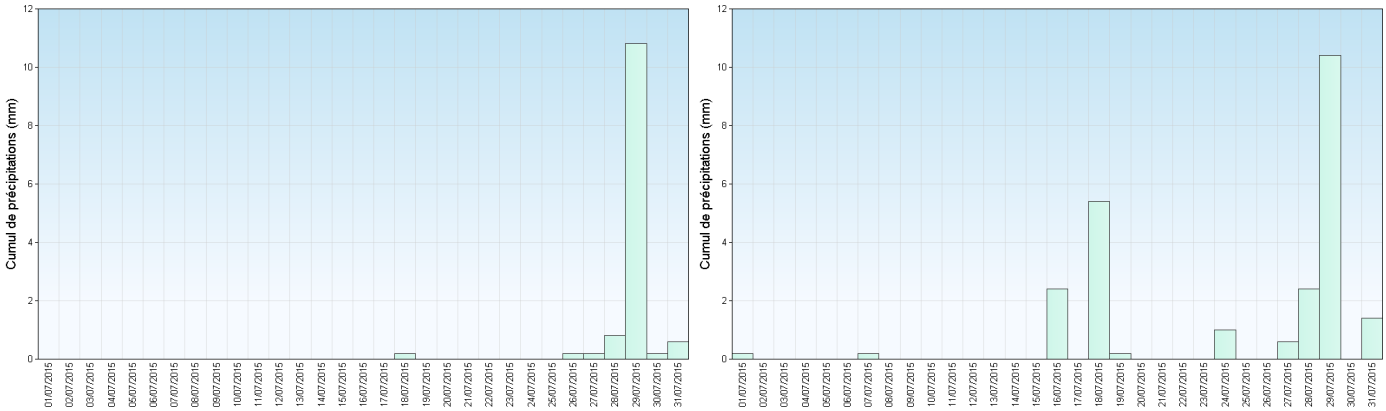
Du 25 au 31: Plus frais et faiblement pluvieux

Un régime d'Ouest modéré se met en place dans une atmosphère rafraichie. Les 26 et 27, sous un ciel très nuageux des averses se produisent. Les 28 et 29, une perturbation traverse la région donnant enfin de la pluie pour tous. Après une accalmie le 30, des pluies faibles se produisent à nouveau le 31.

Brive (19) *Tulle (19)*



Températures minimales et maximales quotidiennes



Précipitations quotidiennes

Directeur de publication : Jean-Marc LACAVE
Rédaction : CM-LIMOGES

METEO FRANCE
Toujours un temps d'avance

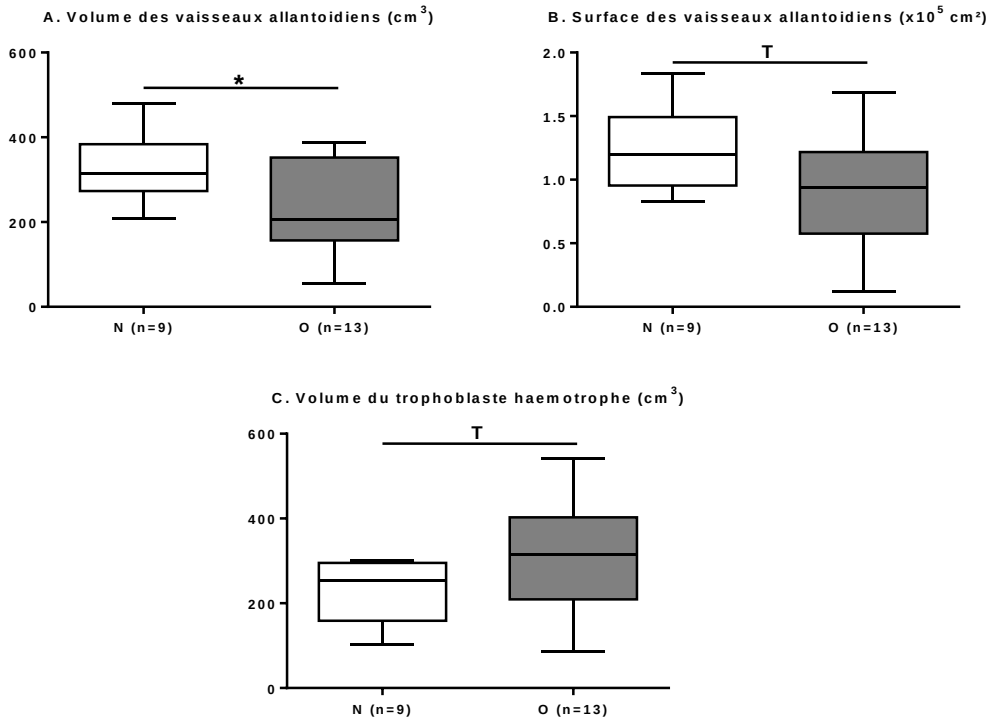


Figure C.2. Volume et surface des différents composants des placentas de juments Normales (N, n=9) ou Obèses (O, n=13)

A. Volume des vaisseaux allantoïdiens. B. Surface des vaisseaux allantoïdiens. C. Volume du trophoblaste haemotrophe. La lettre « T » correspond à une tendance ($p<0.10$). L'étoile correspond à une différence statistiquement significative ($p<0.05$).

3.2. Résultats complémentaires : Effet de l'obésité maternelle sur la structure et la fonction placentaire à terme

L'analyse de la structure et la fonction placentaires à terme a été réalisée par Mlle Emilie Nouveau dans le cadre de son stage de Master 2.

Les données ont été analysées avec le logiciel R (version 3.4.0) en utilisant un modèle linéaire à effet mixte (package nlme (Pinheiro *et al.*, 2017)) suivi d'une ANOVA de type 3 (package car (Fox et Weisberg, 2011)) prenant en compte le lot en effet fixe et l'âge de la jument en effet aléatoire. Le sexe n'avait pas d'effet sur les variables analysées et a donc été retiré du modèle.

3.2.1. Effet de l'obésité maternelle sur la biométrie fœto-placentaire à terme

L'obésité maternelle n'a pas eu d'effet sur la biométrie fœto-placentaire à terme. En effet, aucune différence n'a pu être observée pour le poids, la surface et le volume du placenta ainsi que pour le poids de naissance du poulain et l'efficacité placentaire.

Comme présenté en introduction de ce manuscrit, le poids du poulain et/ou des membranes fœtales ne varie que dans des cas extrêmes de pathologie chez le cheval tels qu'une sous-nutrition sévère associée à une infection à *streptococcus equi* ou de la fourbure (Wilsher et Allen, 2006; Peugnet *et al.*, 2016a; Pazinato *et al.*, 2017). Il n'est donc pas étonnant de ne pas observer de différence entre les lots dans le cas présent.

3.2.2. Effet de l'obésité maternelle sur la structure et la fonction placentaire

Les résultats de structure placentaire sont présentés en Figure C.2. Le volume et la surface des vaisseaux de l'allantoïde étaient moins importants (p=0.03, p=0.06, respectivement) dans les placentas du groupe Obèse que dans les placentas du groupe Normal. Aucune différence n'a pu être observée pour l'épaisseur de la paroi ou encore la surface de la lumière des artérioles de l'allantoïde.

En revanche, le volume du trophoblaste haemotrophe tendait à être plus important (p=0.08) dans les placentas du groupe Obèse que dans les placentas du groupe Normal.

En ce qui concerne la fonction placentaire, seule l'expression d'*IGF2* avait tendance à être diminuée dans les placentas du groupe Obèse par rapport aux placentas du groupe Normal (p=0.08). Aucune

autre différence n'a pu être observée. Afin d'avoir une vision d'ensemble sur l'expression génique, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée mais elle n'a pas permis de distinguer les groupes entre eux.

Chez l'homme, l'obésité maternelle est principalement associée à :

- Des altérations du métabolisme lipidique qui se traduisent par une altération de l'expression et/ou de l'activité des transporteurs d'acides gras, une accumulation de lipides dans le placenta et le développement d'un environnement lipotoxique (production de lipides oxydés) en raison de l'augmentation du stress oxydatif (Jarvie *et al.*, 2010; Dube *et al.*, 2012; Saben *et al.*, 2014).
- Une activation importante des systèmes d'inflammation associée à une altération du développement et de la fonction vasculaire (Stewart *et al.*, 2007; Challier *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2011; Saben *et al.*, 2013; Aye *et al.*, 2014).

En effet, un épaississement de la paroi vasculaire est observé en cas d'obésité ou encore de diabète gestationnel. Cet épaississement, qui correspond à une augmentation du développement des muscles lisses (diminution de l'élasticité du vaisseau) et à une fibrose périvasculaire est également observé dans les placentas de juments souffrant de fourbure (Pietro *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2011; Pazinato *et al.*, 2017). Nous avons aussi observé cet épaississement de la paroi vasculaire dans les placentas des juments recevant des concentrés à partir de la mi-gestation et qui étaient plus résistantes à l'insuline en fin de gestation que les juments témoins (*cf*. Article 2 : Placental function and structure at term is altered in broodmares fed with cereals from mid-gestation). Ainsi, les placentas des individus obèses et résistants à l'insuline auraient une capacité de vasodilatation réduite, ce qui a été observé *in vivo* par vélocimétrie laser chez la femme (Stewart *et al.*, 2007). Cependant, dans le cas présent, aucune différence d'épaisseur de paroi et de surface de lumière n'a été observée entre les deux lots. Cette différence de résultats peut être expliquée par le fait que les juments du lot Obèse et Normal recevaient toutes la même alimentation. En effet, en comparant les mesures réalisées avec les données issues du protocole fourrages *vs* concentrés, l'épaisseur de la paroi et la surface de la lumière des artérioles des placentas des groupes Normal et Obèse correspond aux valeurs obtenues dans les placentas des juments nourries avec des concentrés en deuxième moitié de gestation. Il faut toutefois noter que la vascularisation allantoïdienne des placentas du groupe Obèse était altérée, puisque le volume et la surface des vaisseaux (artérioles et veinules confondues) étaient diminués.

Très peu d'études ont été réalisées sur l'effet de l'obésité maternelle sur le développement trophoblastique. Cependant, il a été montré *in vitro* chez l'Homme que la leptine inhibait l'apoptose et promouvait la prolifération des cellules trophoblastiques (Magariños *et al.*, 2007; Pérez-Pérez *et al.*,

2008; Toro *et al.*, 2014, 2015). Les juments du groupe Obèse présentaient une concentration plasmatique de leptine plus élevée durant toute la gestation, pouvant expliquer l'augmentation du volume du trophoblaste haemotrophe dans les placentas du groupe Obèse. Cette différence n'était qu'une tendance, mais la puissance de test n'était que de 44%. L'analyse de plus d'individus aurait peut-être pu permettre de confirmer ce résultat.

Les résultats montrant une augmentation de l'inflammation systémique (estimée en mesurant les concentrations plasmatiques en sérum amyloïde A) durant la gestation chez les juments obèses indiquent que l'analyse de l'expression placentaire de gènes impliqués dans les phénomènes d'inflammation ou encore l'analyse de l'activité des transporteurs serait plus appropriée. Une analyse à haut débit (RNA-Seq) de ces échantillons doit donc être envisagée.

En conclusion l'obésité maternelle durant la gestation n'altère pas la croissance du poulain et des annexes fœtales à terme. Cependant, une diminution de la surface et du volume des vaisseaux de l'allantoïde est observée dans les placentas des juments obèses, trahissant certainement des altérations de la mise en place de la vascularisation placentaire, comme observées dans les placentas de femmes obèses.

3.3. Résultats complémentaires : Effet de l'obésité maternelle sur la qualité du colostrum et du lait jusqu'au 3ème mois de lactation

La qualité du colostrum a été analysée par la technique de spectrométrie proche infrarouge par Anne Ferlay et ses collaborateurs, dans l'équipe Performance des Animaux et des Troupeaux (PERAQ) de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (Inra de Theix) : lactose, matière grasse et protéines totales. La concentration en immunoglobulines G (IgG) a été mesurée à l'aide d'un Colotest® (refractomètre) (Cash, 1995; Chavatte *et al.*, 1998).

Les profils en acides gras du lait, du plasma de juments et du plasma de poulains ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse par Delphine Rousseau-Ralliard et Tiffanie Josse pour son stage de dernière année de DUT à la naissance (avant la première tétée), 10 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois d'âge/lactation.

Les données ont été analysées avec le logiciel R (version 3.4.0). La qualité du colostrum a été analysée en utilisant un modèle linéaire à effet fixe suivi d'une ANOVA de type 3 (package car (Fox et Weisberg, 2011)) prenant en compte le lot de la jument (Obèse ou Normale). L'âge de la jument n'influençait pas la qualité du colostrum, ce facteur n'a donc pas été ajouté dans le modèle. Par souci de simplicité, les données concernant les profils en acides gras du lait et des plasmas de juments et de poulains ont été analysées :

- à l'aide d'une analyse en composante principale (ACP, package FactomineR (Lê *et al.*, 2008)) pour chaque stade et chaque prélèvement. L'ACP permet de prendre en compte le fait que les acides gras sont des variables corrélées entre elles, cette méthode d'analyse est donc plus adaptée aux données. Une analyse factorielle multiple (AFM (Escofier et Pagès, 1994)) aurait pu être utilisée afin de considérer les trois prélèvements à la fois mais le résultat est alors extrêmement complexe à interpréter. Une ACP a également été utilisée pour analyser les différences de profils en acides gras entre les différents mois de lactation, toutes juments confondues.
- à l'aide d'un modèle linéaire à effet mixte (package nlme (Pinheiro *et al.*, 2017)) suivi d'une ANOVA de type 3 (package car) prenant en compte le temps en effet fixe et l'individu en effet aléatoire pour étudier l'évolution de la composition des différents prélèvements au cours du stade de lactation.

Les résultats sont présentés sous forme de médiane [Q1-Q3].

3.3.1. Effet de l'obésité maternelle sur la composition du plasma de jument à terme et du poulain à la naissance

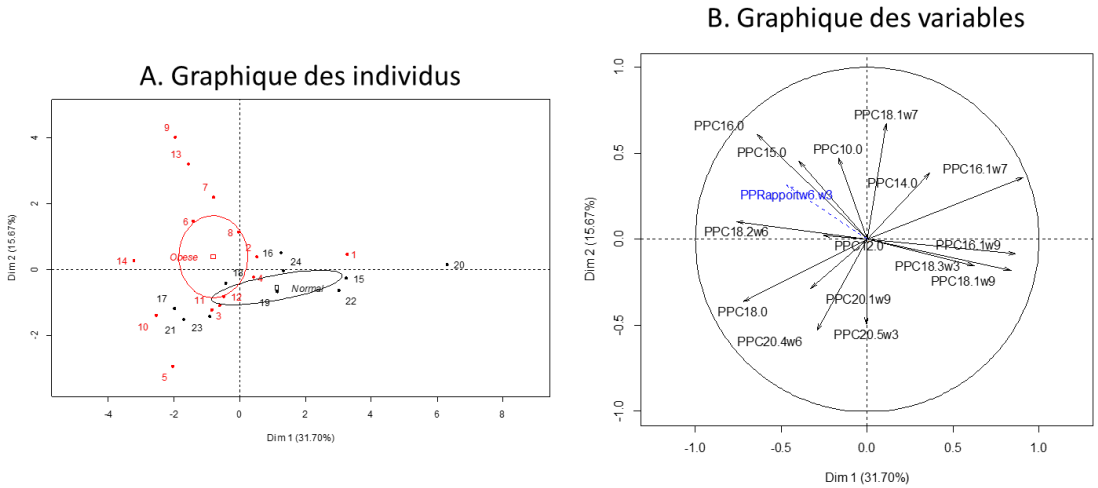


Figure C.3. Profils en acides gras du plasma à la naissance de poulains nés de juments Normales (N, n=10) ou Obèses (O, n=14)

A. Le graphique des individus reprend la disposition des individus par rapport aux deux premières dimensions. Les ellipses de confiance ont pour centre le centre de gravité des individus. Ici les individus sont séparés par lot sur la dimension 1 (p=0.03). B. Le graphique des variables permet de corréler la position des individus sur les 2 premières dimensions avec les variables correspondantes.

La Figure C.3 présente la composition en acides gras des plasmas de poulain (avant tétée) à la naissance. Au moment du poulinage, aucune différence n'a pu être observée concernant la composition en acides gras du plasma des juments entre les deux lots. Cependant, malgré une concentration en acides gras totaux équivalente entre les deux lots, les poulains du groupe Obèse avaient un plasma moins riche en acide alpha-linolénique (ALA, C18:3ω3, $p<0.001$) et plus riche en acide linoléique (LA, C18:2ω6, $p<0.0001$) à la naissance que les poulains du groupe Normal. Cette différence était associée à une augmentation du ratio ω-6/ω-3 dans le plasma des poulains du groupe Obèse ($p=0.02$). Les poulains du lot Obèse présentaient également une proportion plasmatique plus importante d'acide palmitique (C16:0, $p<0.001$) et d'acide stéarique (C18:0, $p<0.0001$) ainsi qu'une diminution des concentrations en acide hypogéique (C16:1ω9, $p<0.0001$), palmitoléique (C16:1ω7, $p<0.0001$) et d'acide oléique (C18:1ω9, $p<0.0001$) en comparaison des poulains du lot Normal.

Les acides gras ω-3 et -6 sont des acides gras essentiels, non synthétisables par les mammifères (Dunbar et Bauer, 2002). Ainsi, les concentrations en acides gras essentiels reflètent l'état nutritionnel de l'individu (King *et al.*, 2007; Hodge *et al.*, 2017). Dans le cas présent, les juments étaient nourries exactement avec le même régime : elles recevaient du foin, du foin enrubanné et de l'orge aplati provenant tous des mêmes lots. L'absence de différence de composition plasmatique en acides gras essentiels entre les deux lots de juments au poulinage serait donc lié à cette même alimentation. La différence de composition en acides gras dans le plasma des poulains à la naissance avant la tétée est cependant plus étonnante. Cette différence pourrait être due :

-A une modification de la quantité et/ou de l'activité des transporteurs placentaires d'acides gras bien que nous n'ayons pas observé de différence d'expression placentaire pour la *lipoprotéine lipase* (*LPL*) et le *cluster de différenciation 36* (*FAT/CD36*) entre les deux lots. Cependant, il a été montré *in vitro*, que les cellules trophoblastiques des femmes obèses présentent une diminution de l'activité de la LPL ainsi que du transport de l'acide linoléique (C18:2ω6) (Dubé *et al.*, 2012). De plus, la protéine fatty acid binding protein 3 (FABP3) serait l'acteur principal du transfert des acides gras polyinsaturés ω-3 dans le placenta (Islam *et al.*, 2016).

-A une modification du métabolisme lipidique placentaire. En effet, les placentas des femmes obèses présentent des altérations du métabolisme lipidique, reflétant un environnement lipotoxique et une accumulation lipidique sous forme de gouttelettes lipidiques (Saben *et al.*, 2014).

Chez l'homme, le rapport ω-6/ω-3 est augmenté dans l'artère ombilicale à la naissance dans le cas de diabète gestationnel (résistance à l'insuline), semblant confirmer ainsi nos observations (Ortega-Senovilla *et al.*, 2009).

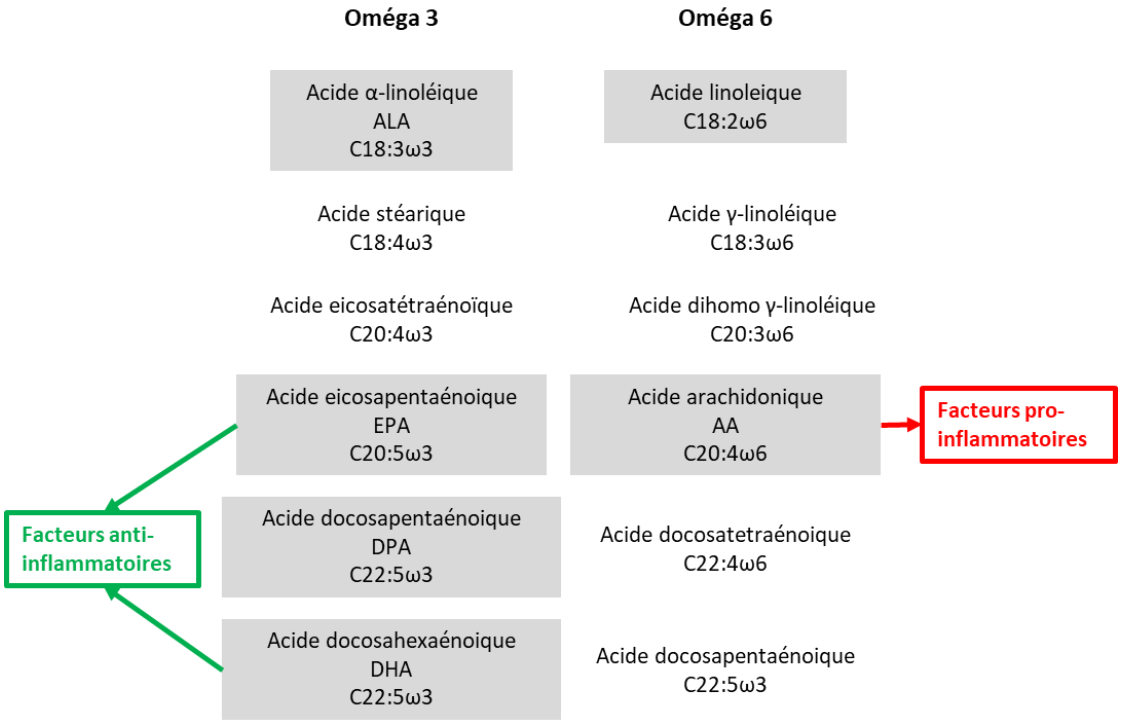


Figure C.4. Schéma simplifié de l'élongation des acides gras ω-3 et ω-6 et de leurs effets (d'après Gleissman et al., 2010)

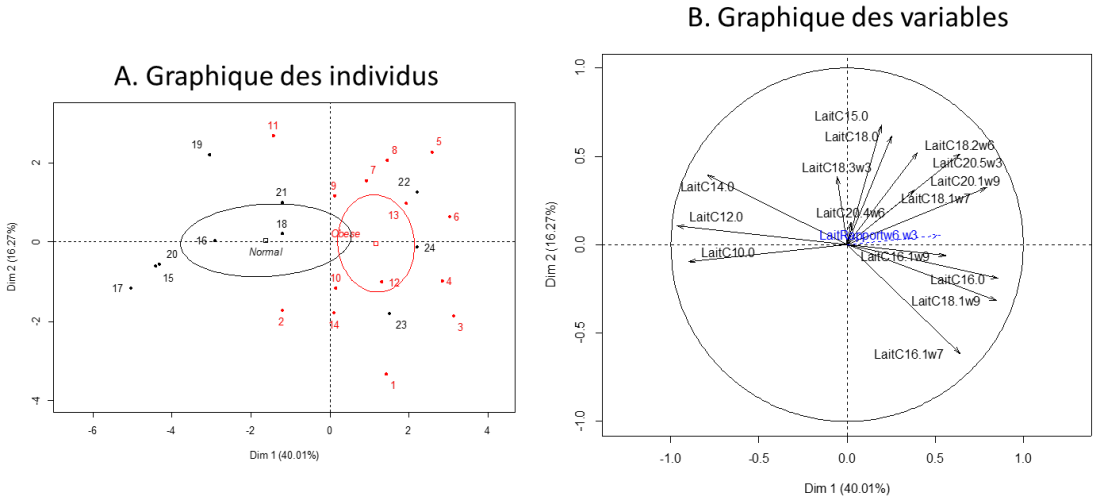


Figure C.5. Profils en acides gras du colostrum de juments Normales (N, n=10) ou Obèses (O, n=14)

A. Le graphique des individus reprend la disposition des individus par rapport aux deux premières dimensions. Les ellipses de confiance ont pour centre le centre de gravité des individus. Ici les individus sont séparés par lot sur la dimension 1 ($p<0.01$). B. Le graphique des variables permet de corréler la position des individus sur les 2 premières dimensions avec les variables correspondantes.

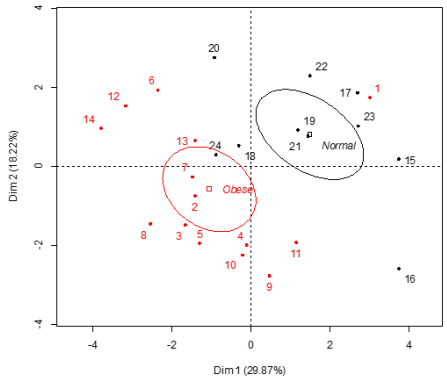
L'acide alpha-linolénique (ALA, C18:3w3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5ω3) sont des acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Ce sont des précurseurs de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6ω3) qui joue un rôle essentiel dans le développement du cerveau chez de nombreuses espèces (Dyall, 2015) (Figure C.4.). Chez le cheval, il a été montré qu'une supplémentation en DHA de 250 jours de gestation à 74 jours de lactation améliorait la mémoire à long-terme et les capacités d'apprentissage des chevaux à l'âge de 2 ans (Adkin *et al.*, 2015). D'après l'ACP, les poulains du groupe Obèse avaient un plasma moins riche en ALA à la naissance. Après confirmation en utilisant un modèle linéaire à effet fixe pour cet âge, les poulains du groupe Obèse avaient un plasma moins riche en ALA ($p=0.04$) et en EPA ($p=0.01$) à la naissance. La concentration plasmatique de DHA n'a pas pu être comparée car cet acide gras n'a pu être détecté dans les plasmas. Cependant, la concentration plasmatique en acide docosapentaénoique (DPA, C22:5w3) a été détectée uniquement dans le plasma des poulains du lot Normal, semblant confirmer ainsi une diminution des acides gras dérivés de l'ALA dans le plasma des poulains du lot Obèse. Comme il a été discuté dans l'article rédigé sur ce protocole, l'obésité maternelle et particulièrement l'inflammation systémique associée entrainent des altérations du comportement de la descendance. Les proportions d'acides gras mesurés dans le plasma des poulains à la naissance reflètent la nutrition *in utero* puisque les poulains n'avaient pas encore tété. Ainsi, il est possible que l'obésité maternelle, de par l'inflammation mais également le métabolisme particulier des acides gras, entraine des altérations du développement du système nerveux central et donc du comportement et des capacités d'apprentissage des chevaux à long-terme. Ces effets, qui restent à être confirmés, pourraient entrainer une diminution des performances sportives des animaux.

Enfin, la diminution de la proportion en acides gras monoinsaturés ω-7 et -9 et l'augmentation de la proportion en acide palmitique (C16:0) peut être reliée à l'augmentation de l'inflammation systémique chez les poulains à la naissance. En effet, il a été montré que l'acide palmitoléique (C16:1ω7, $p<0.01$) réduisait l'inflammation systémique, *in vitro* et *in vivo* chez de nombreuses espèces (Bernstein *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2017) et que l'acide palmitique et l'acide stéarique possédaient de fortes propriétés pro-inflammatoires (Baer *et al.*, 2004; Joshi-Barve *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014b; Fritsche, 2015; Miao *et al.*, 2015; Snodgrass *et al.*, 2016).

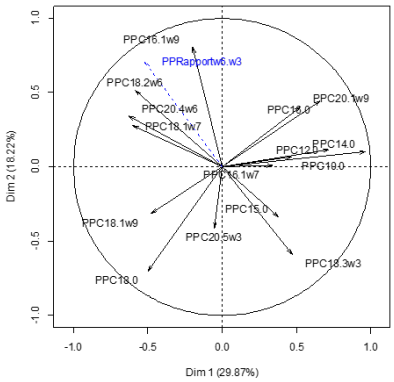
3.3.2. Effet de l'obésité maternelle sur la composition du colostrum à la naissance

Aucune différence de concentration en lactose, matière grasse, protéines totales et en IgG n'a été observée entre les deux lots dans le colostrum au poulinage. La Figure C.5 présente la composition en acides gras dans le colostrum. Aucune différence n'a été observée pour la concentration en acides gras

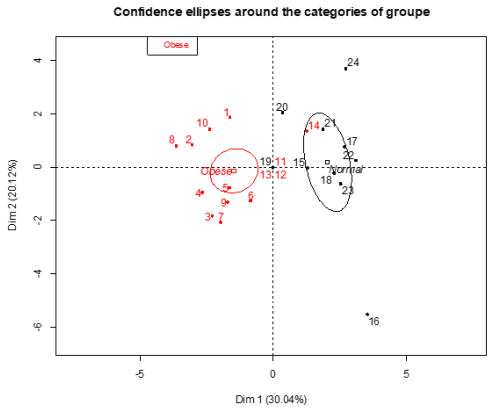
A. 1 mois, graphique des individus



B. 1 mois, graphique des variables



C. 3 mois, graphique des individus



D. 3 mois, graphique des variables

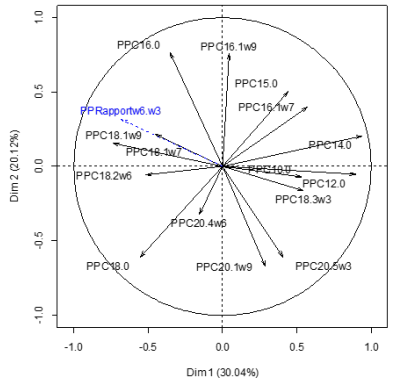


Figure C.6. Profils en acides gras du plasma de poulains nés de juments Normales (N, n=10) ou Obèses (O, n=14) à 1 et 3 mois

A. Le graphique des individus reprend la disposition des individus par rapport aux deux premières dimensions. Les ellipses de confiance ont pour centre le centre de gravité des individus. Ici les individus sont séparés par lot sur la dimension 1 (1 mois: $p<0.01$, 3 mois: $p<0.0001$). B. Le graphique des variables permet de corréler la position des individus sur les 2 premières dimensions avec les variables correspondantes.

entre les deux lots. Cependant, le colostrum des juments du groupe Obèse était moins riche en acides gras saturés à moyenne chaîne (acide caprique, C10:0, p<0.0001, acide laurique, C12:0, p<0.0001, et acide myristique, C14:0, p<0.0001) par rapport au colostrum des juments du groupe Normal. De plus, les juments du groupe Obèse avaient un colostrum plus riche en acide palmitique (C16:0, p<0.0001) que les juments du groupe Normal ainsi qu'en acides gras monoinsaturés tels que l'acide hypogéique (C16:1ω9, p<0.001), l'acide palmitoléique (C16:1ω7, p<0.0001) et l'acide oléique (C18 :1ω9, p<0.0001). Les juments du groupe obèse produisaient enfin un colostrum plus riche en acide gras à longue chaîne ω-6 (C18:2ω6, p<0.0001), ce qui entrainait une augmentation du ratio des acides gras ω-6/ω-3.

L'absence de différence de concentration en IgG dans le colostrum ne signifie pas absence de différence entre les deux lots. En effet, la quantité de colostrum produite n'a pas été mesurée. Or il a été montré chez la brebis que la surnutrition durant la gestation n'altère par la concentration d'IgG du colostrum mais diminue la quantité de colostrum produite et donc la quantité d'IgG ingérée par les agneaux à la naissance (Swanson *et al.*, 2008; Hammer *et al.*, 2011). De plus, une étude réalisée chez le cheval montre qu'une supplémentation en huile de poisson à partir de 28 jours avant le poulinage n'entraine pas de modification de la concentration en IgG du colostrum ni du sérum de la jument et du poulain à la naissance (Hodge *et al.*, 2017).

Il est intéressant de noter que le plasma des poulains du groupe Obèse était moins riche en acides gras monoinsaturés à la naissance, alors que le colostrum en contrepartie était lui, plus riche en ces acides gras. Malgré ce phénomène, l'enrichissement du colostrum du groupe Obèse en acide palmitique (C16:0) et en acide linoléique (C18:2ω6), associés à une augmentation du rapport acides gras ω-6/ω-3, confirme le statut pro-inflammatoire déjà observé chez les poulains à la naissance avant la tétée.

3.3.3. Effet de l'obésité maternelle sur la composition du lait en acides gras jusqu'au sevrage

Aucune différence n'a pu être observée entre les lots pour les profils en acide gras des plasmas de jument et le lait jusqu'au troisième mois de gestation. Je n'ai pas pu analyser les résultats du sixième mois de lactation car les concentrations en acides gras étaient trop faibles ou non détectables.

A 10 jours d'âge, aucune différence n'a pu être observée entre les poulains des deux lots. Cependant, il faut noter que cette date coïncide avec les chaleurs de lait de la jument, comme présenté dans la section suivante (partie 4) et qu'elle représente un stade physiologique très particulier.

La Figure C.6 présente les ACP réalisées sur les profils des plasmas de poulains à 1 et 3 mois d'âge. A l'âge de 1 et 3 mois, les poulains du lot Obèse avaient un plasma plus riche en acide linoléique

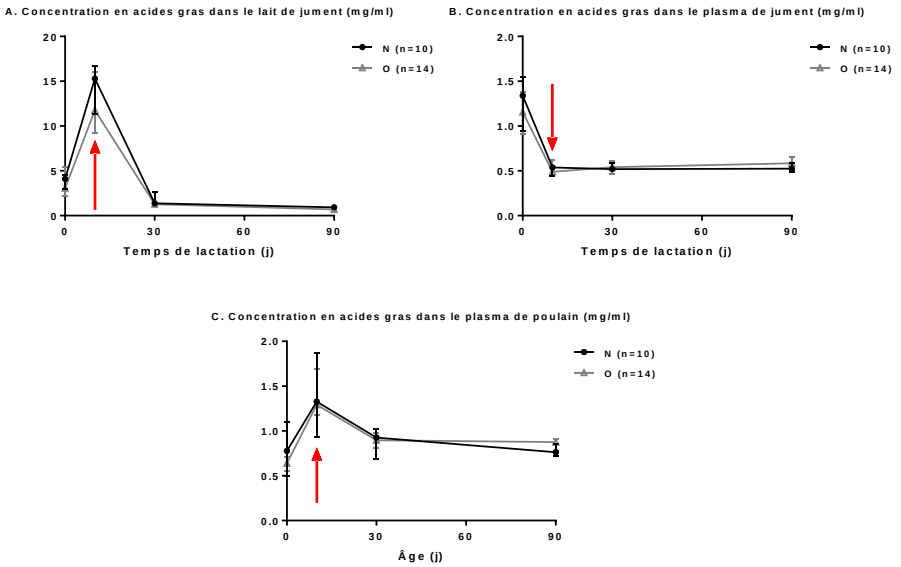


Figure C.7. Evolution de la concentration en acides gras dans le lait de jument (A), le plasma de jument (B) et le plasma de poulain (C) de la naissance à 3 mois de lactation (n=24)

Les flèches rouges marquent l'augmentation importante dans le lait de jument et le plasma de poulain et la chute dans le plasma de jument de la concentration en acides gras à 10 jours de lactation.

(C18:2ω6, M1 : p<0.01, M3 : p=0.01), en acide stéarique (C18:0, M1 : p=0.01, M3 : p<0.01), en acide oléique (C18 :1ω9, M1 : p=0.02, M3 : p=0.03) et en acide vaccénique (C18 :1ω7, M1 : p<0.01, M3 : p<0.001) que les poulains du lot Normal. Les poulains du lot Obèse avaient également un plasma plus pauvre en acides gras saturés à moyenne chaîne tels que l'acide caprique (C10:0, M1 : p=0.02, M3 : p<0.001), l'acide laurique (C12:0, M1 : p<0.0001, M3 : p<0.0001) et l'acide myristique (C14:0, M1 : p<0.0001, M3 : p<0.0001). Enfin, les poulains du lot Obèse présentaient un plasma appauvri en ALA (C18:3w3, M1 : p=0.02, M3 : p<0.01) et donc enrichi en acides gras ω-6 rapportés par rapport aux acides gras ω-3 (M1 : p<0.01, M3 : p<0.01). A 3 mois, les poulains du lot Obèse présentaient également un plasma plus pauvre en EPA (C20:5ω3, p=0.048).

Malgré l'absence de différence de la composition du plasma maternel et du lait en fonction des lots, les poulains du lot Obèse présentaient jusqu'à au moins l'âge de 3 mois un plasma enrichi en acides gras saturés à longue chaîne et en acides gras ω-6 et appauvri en acides gras ω-3 et en acides gras saturés à moyenne chaîne, ce qui correspond à un profil pro-inflammatoire. Les acides gras essentiels reflètent l'alimentation des animaux, il est donc étonnant de constater quand même des différences entre les lots alors que les poulains semblent tous avoir accès à la même qualité de lait et sont conduits dans la même pâture. Une hypothèse qui pourrait alors expliquer cette différence serait le comportement alimentaire. Les poulains commencent à ingérer de l'herbe très rapidement après la naissance. A 1 semaine, ils passent déjà un peu moins de 10% de leur temps à pâturer (Tyler, 1972; Crowell-Davis *et al.*, 1985). Cette proportion augmente avec l'âge pour atteindre environ 50% du temps à 5 mois. Chez les bovins notamment, il a été montré que le pâturage diminue le ratio en acides gras ω-6/ω-3 dans le tissu adipeux intramusculaire en comparaison d'un régime à base de concentrés (French *et al.*, 2000; Noci *et al.*, 2005; Daley *et al.*, 2010). Chez l'homme et le macaque, les descendants de mères obèses ou surnourries présentent une augmentation de l'anxiété (Contu et Hawkes, 2017; Thompson *et al.*, 2017a). De plus, il a été montré chez le rat et le mouton que les descendants de mères surnourries passaient plus de temps à téter que les descendants de mères témoins (Muhlhausler *et al.*, 2006; Purcell *et al.*, 2011). Il serait ainsi possible que les poulains du groupe Obèse tètent plus et broutent moins que les poulains du groupe Normal, expliquant ainsi cette différence de composition plasmatique en acides gras.

En conclusion, le profile en acides gras des poulains jusqu'à l'âge de 3 mois est bien corrélé avec les résultats métaboliques observés (augmentation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline) durant la période du pré-sevrage. Ces altérations pourraient être associées à des modifications du comportement alimentaire des animaux durant cette période.

3.3.4. Evolution de la composition du lait en acides gras en fonction du temps de lactation

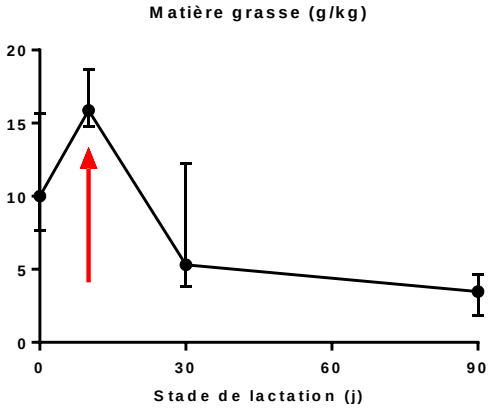


Figure C.7. Evolution de la proportion de matière grasse le lait de jument de la naissance à 3 mois de lactation sur l'ensemble des laits de jument analysés sur les dernières années (n=74)

Les flèches rouges marquent l'augmentation importante de la proportion de matière grasse à 10 jours de lactation dans le lait de jument.

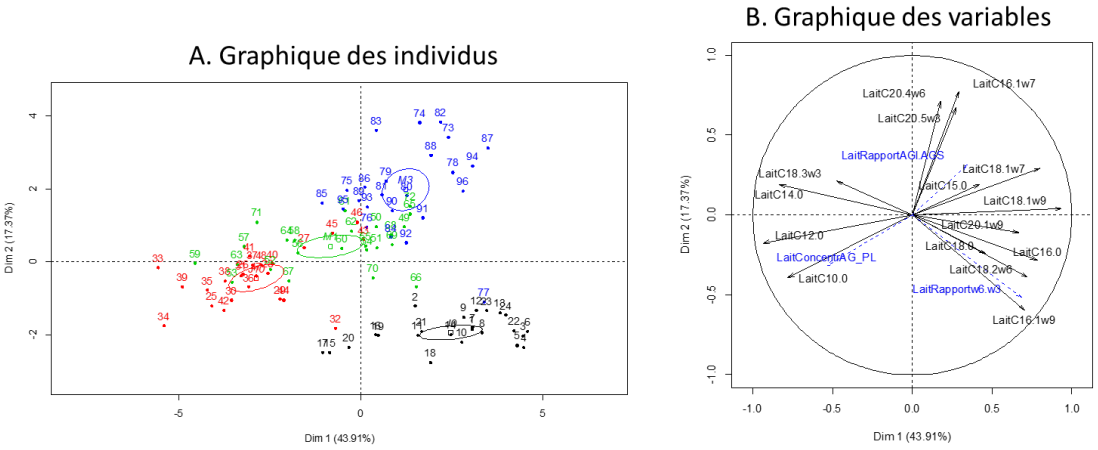


Figure C.8. Evolution du profil en acides gras du lait de juments entre la naissance et 3 mois de lactation

A. Le graphique des individus reprend la disposition des individus par rapport aux deux premières dimensions. Les ellipses de confiance ont pour centre le centre de gravité des individus. Ici les individus sont séparés par stade de lactation sur la dimension 1 ($p<0.0001$).

B. Le graphique des variables permet de corréler la position des individus sur les 2 premières dimensions avec les variables correspondantes.

L'évolution de la concentration en acides gras est présentée en Figure C.7. A 10 jours, la concentration en acides gras dans le lait et dans le plasma du poulain augmentent de façon importante en comparaison aux autres stades de lactation ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectivement). Cette augmentation est associée à une diminution importante de la concentration en acides gras dans le plasma de jument entre la naissance et 10 jours de lactation ($p<0.0001$).

Ce stade particulier de lactation correspond aux « chaleurs de lait » de la jument qui se déclarent autour de 8 jours postpartum et qui entrainent un épisode diarrhéique chez le poulain (Allar *et al.*, 2013). Peu d'études ont été réalisées afin de comprendre l'origine des diarrhées chez les poulains à ce stade de lactation. Ces études sont pour la plupart anciennes et la composition en acides gras du lait n'a jamais été étudiée dans ce contexte. Les auteurs ont cependant observé une association positive entre les concentrations en phosphore, sodium et lactose et la diarrhée chez le poulain. L'hypothèse d'un enrichissement en acides gras du lait n'a jamais été proposée ni validée, car il n'a jamais été observé d'évolution de la concentration en matière grasse du lait à ce stade de lactation (Johnston *et al.*, 1970; Bouwman et Schee, 1978; Oftedal *et al.*, 1983; Pieszka et Luszczynski, 2013). De plus, l'association entre l'œstrus maternel et la diarrhée du poulain n'a pas pu être démontrée, les auteurs observant néanmoins un changement important du microbiote intestinal chez les poulains durant la deuxième semaine post-natale (Kuhl *et al.*, 2011). Dans le cas présent, la proportion en matière grasse totale du lait a été mesurée jusqu'à 5 mois de lactation. Cependant, lorsque tous les dosages réalisés sur le lait des juments des différents protocoles du projet FOETALIM (4 protocoles, 2011-2015, ponettes, juments de trait et de selle, n=74) sont compilés, l'augmentation de la proportion en acides gras observée par chromatographie en phase gazeuse à 10 jours est validée par une augmentation de la proportion de matière grasse ($p<0.0001$) dans le lait après dosage par spectrométrie proche infrarouge (Figure C.8). Dans le cas présent, l'augmentation de la quantité en matière grasse du lait pourrait être également en partie à l'origine de la diarrhée du poulain, possiblement par le changement brusque de la composition du régime du fait de la modification de la composition du lait, ou simplement du fait de la teneur élevée du lait en acides gras.

L'augmentation de la quantité d'acide gras dans le lait à 10 jours s'accompagne d'une augmentation de la concentration en acides gras saturés à moyenne chaîne (C10:0, $p<0.0001$, C12:0, $p<0.0001$ et C14:0, $p<0.0001$) et en ALA (C18:3ω3, $p<0.0001$), d'un appauvrissement en acides gras monoinsaturés ω-6, -7 et -9 (C16:1ω7, $p<0.01$, C16:1ω9, $p<0.0001$, C18:1ω7, $p<0.0001$, C18:1ω9, $p<0.0001$, C20:1ω9, $p<0.0001$ et C18:2ω6, $p<0.0001$) et d'une diminution des rapports acides gras ω-6/ω-3 et acides gras saturés/acides gras insaturés dans le lait (Figure C.9), ce qui correspond à un profil plutôt anti-inflammatoire.

La différence de composition en acides gras du plasma maternel est moins remarquable que celle du lait. En effet, aucune différence marquée n'est observée particulièrement au 10ème jour de gestation. De la même manière, la composition du plasma de poulain est particulièrement différente entre la naissance et les autres âges, mais le 10ème jour reflète simplement la transition entre un plasma de nouveau-né et un plasma de poulain plus âgé.

En conclusion, les poulains nés de juments obèses durant la gestation présentent un profil en acides gras plasmatique altéré depuis la naissance qui peut être associé aux modifications métaboliques et inflammatoires observées durant la croissance.

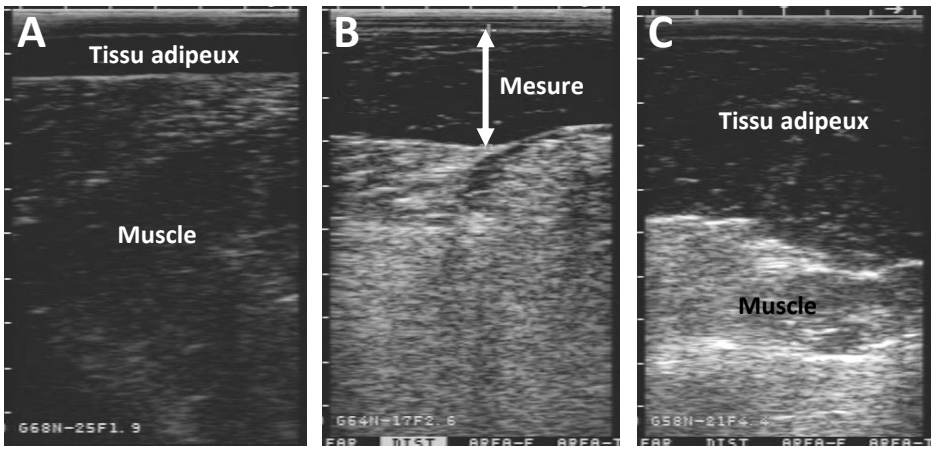


Figure C.9. Mesures échographiques de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané entre les muscles glutéal-biceps et semi-tendineux

Epaisseur de tissu adipeux sous-cutané chez une jument maigre. Il n'y a pas de dépression en forme de triangle inversé au niveau de l'insertion entre les deux muscles, la couche de tissu adipeux sous-cutané a une épaisseur constante.

A. Epaisseur de tissu adipeux sous-cutané chez une jument en état corporel optimal. La dépression au niveau de l'insertion entre les deux muscles est bien dessinée, l'aponévrose est bien visible et le point de mesure se trouve très aisément.
B. Epaisseur de tissu adipeux sous-cutané chez une jument obèse. La séparation entre le tissu adipeux et le muscle n'est plus aussi nette que chez d'autres juments et les mesures deviennent plus compliquées.

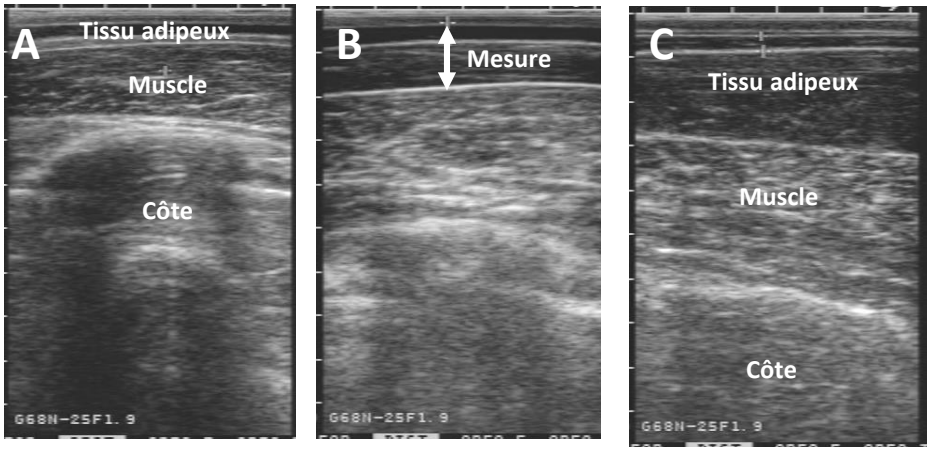


Figure C.10. Mesures échographiques de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané au niveau des côtes

A. Epaisseur de tissu adipeux sous-cutané chez une jument maigre.
B. Epaisseur de tissu adipeux sous-cutané chez une jument en état corporel optimal.
C. Epaisseur de tissu adipeux sous-cutané chez une jument obèse.

4. Etude annexe aux travaux de thèse : mise au point d'une méthode alternative permettant d'évaluer l'état corporel de la jument gestante

La note d'état, comme présenté en introduction (cf. Chapitre 1, paragraphe), est une méthode semi-quantitative d'estimation de l'état corporel d'un cheval. Elle est pratique, peu coûteuse, mais reste très dépendante de la conformation de l'animal. Ainsi, elle ne semble pas très bien adaptée pour l'évaluation de l'état corporel des juments gestantes. L'échographie de l'épaisseur de gras sous-cutané au niveau de la croupe est une méthode sensible, quantitative et reproductible. Ainsi, nous avons tenté de valider l'utilisation de cette méthode chez les juments gestantes.

4.1. Protocole de mesure de l'épaisseur de gras sous cutané à la croupe et aux côtes par échographie

La méthode peut être réalisée sur l'animal au préalable tondu et rasé (hiver) ou sur un cheval à poil court (été) en utilisant de l'alcool en place et lieu du gel d'échographie. Deux régions anatomiques ont été mesurées :

- **Croupe : à l'insertion entre les muscles glutéal-biceps et semi-tendineux** (Figures C.10 et A.10) qui se reconnait à la dépression formée par le tissu adipeux entre les deux muscles en forme de triangle inversé. Cette zone se trouve à environ 10 cm vers le haut de la base de la queue et 5 cm sur le côté de la colonne vertébrale. La mesure a été réalisée depuis la peau jusqu'à l'aponévrose entre le tissu adipeux et le muscle. La variation intra-expérimentateur (calculé sur 3 mesures de 215 juments) était de 1,54% (±1,72%), la variation inter-expérimentateur (calculée entre 3 différents expérimentateurs sur 11 juments) était de 1,66% (±2,94%). Une variation intra-expérimentateur a également été calculée sur 10 mesures successives effectuées sur 10 juments, elle était de 1 ,17% (±0,60%).
- **Côtes : à la 9ème côte** (Figure C.11), ce qui correspond à la côte se situant sous la base du garrot. La mesure a été réalisée sur la côte, depuis la peau jusqu'à l'aponévrose entre le tissu adipeux et le muscle. Seulement 43 juments ont été mesurées aux côtés. Ainsi, uniquement la variation intra-expérimentateur a pu être calculée sur 3 mesures : 2,84% (±2,60%).

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (version 3.4.0) en réalisant un modèle de croissance exponentielle directement implémenté dans le logiciel.

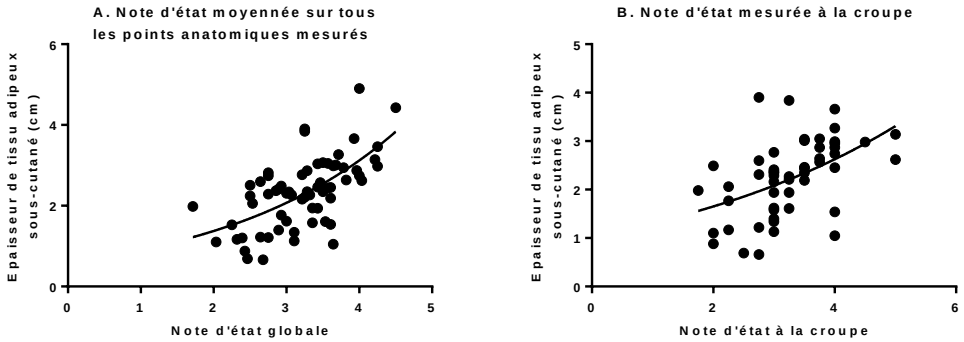


Figure C.11. Corrélation entre la mesure d'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané à la croupe mesurée par échographie et la note d'état globale ou à la croupe chez des juments non gestantes

A. Note d'état moyennée sur tous les points anatomiques mesurés (courbe de croissance exponentielle, r^2=0,38, p<0,0001).
B. Note d'état réalisée à la croupe (r^2=0,15, p<0,01)

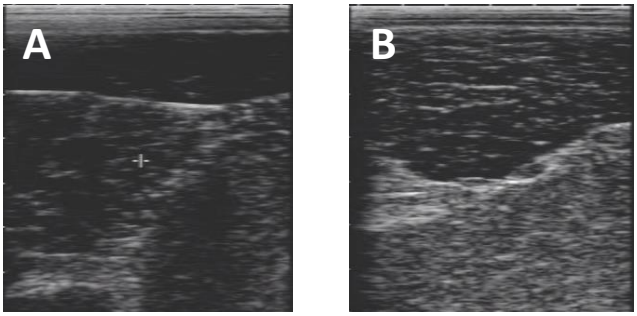


Figure C.12. Cas de juments où la note d'état estimée est très différente de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané mesurée

A. Jument présentant une note d'état élevée (3,75) mais une épaisseur de tissu adipeux sous-cutané faible (1,65cm).
B. Jument présentant une note d'état faible (2,25) mai une épaisseur de tissu adipeux sous-cutané élevée (3,53cm).

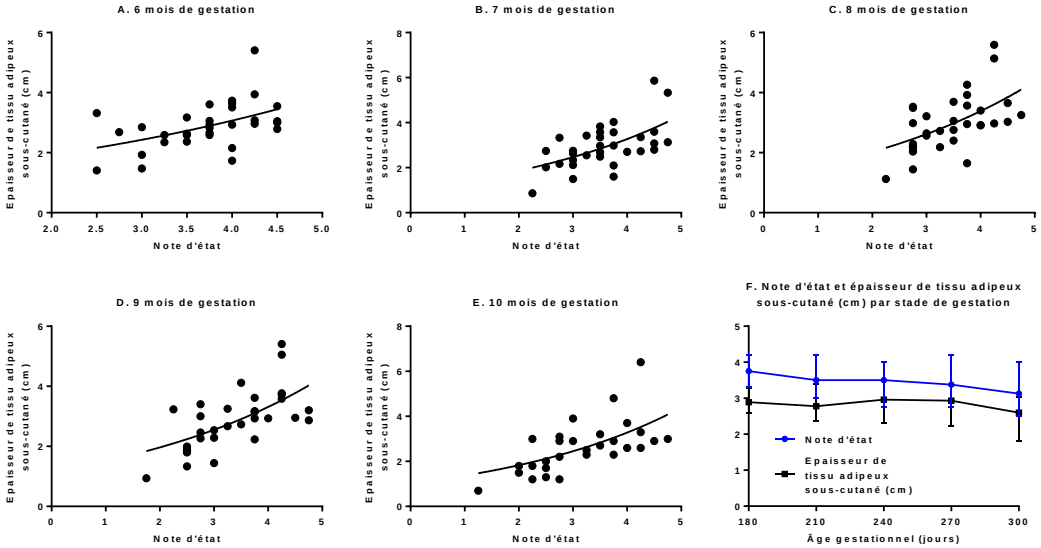


Figure C.13. Corrélation entre la mesure d'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané à la croupe mesurée par échographie et la note d'état chez des juments gestantes en fonction du stade de gestation

A. 6ème mois de gestation (r^2=0,19, p<0,01). B. 7ème mois de gestation (r^2=0,30, p<0,001). C. 8ème mois d gestation (r^2=0,22, p<0,01). D. 9ème mois de gestation (r^2=0,27, p<0,01). E. 10ème mois de gestation (r^2=0,25, p<0,01). F. Evolution de la note d'état et de l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané en fonction du temps de gestation.

4.2. Mesures échographiques chez la jument non gestante

La méthode a tout d'abord été testée sur des juments non gestantes (55 juments de la jumenterie du Pin de l'IFCE, de race Anglo-Arabe, Selle Français et Trotteur Français et 10 juments de la station expérimentale de Chamberet de race Anglo-Arabe). Ces juments étaient des animaux sédentaires, qui vivaient en pâture au moment des mesures. Les mesures de notes d'état ont été réalisées par 4 examinateurs pour chaque partie du corps de l'animal (encolure, épaule, arrière de l'épaule, garrot, ligne du dos, croupe, attache de la queue) selon les recommandations (Arnaud et al., 1997). Ces mesures ont été par la suite moyennées afin d'obtenir la note d'état globale de l'animal.

Comme ce qui avait été observé par Hevouet (2012) dans sa thèse d'exercice vétérinaire et Silva et al., (2015), la relation entre les mesures échographiques et la note d'état est de type croissance exponentielle (Figure C.12 A). Entre la note d'état globale et la mesure à la croupe, nous observons un coefficient de corrélation ajusté r^2=0,38 ($p<0,0001$). Dans la littérature, le coefficient de corrélation entre la mesure échographique et la note d'état varie en fonction des études, de r^2=0,04 jusqu'à r^2=0,98 en mesurant exactement les mêmes points (El-Maaty et al., 2014, Hervouet, 2012, Silva et al., 2015, Superchi et al., 2014), mais également entre les races (meilleure corrélation chez les chevaux de selle Italien que chez les Pur-sang Anglais), selon le sexe (meilleure corrélation chez les juments et les étalons que chez les hongres) et selon l'âge (meilleure corrélation chez les individus de moins de 4 ans que chez les individus plus âgés) (Superchi et al., 2014). De façon curieuse, la corrélation entre la note d'état à la croupe et la mesure échographique était moins importante (r^2=0,15, $p<0,01$) qu'avec la note d'état globale (Figure C.12 B). Nous avons remarqué que la forme de la croupe pouvait être trompeuse en ce qui concernait la notation de l'état corporel de la jument : ronde et musculeuse, elle est notée haute, mais lorsque la mesure échographique est réalisée, l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané est très faible. D'un autre côté, une croupe creusée peut être notée basse mais être très peu musclée et grasse (Figure C.13).

4.3. Mesures échographiques chez la jument gestante

Chaque mois entre le 6ème mois de gestation et le 10ème mois de gestation, la note d'état a été mesurée par deux expérimentateurs (Joseph Bellonie et Cédric Dubois) et l'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané a été mesurée au niveau de la croupe (n=32 juments) et des côtes (n=13 juments) par un expérimentateur (Cédric Dubois). La corrélation était de r^2=0,19 ($p<0,01$) au 6ème mois de gestation, de r^2=0,30 ($p<0,001$) au 7ème mois de gestation, de r^2=0,22 ($p<0,01$) au 8ème mois de gestation, de r^2=0,27 au 9ème mois de gestation ($p<0,01$) et enfin de r^2=0,25 ($p<0,01$) au 10ème mois de gestation (Figure C.14 A à E). Ces corrélations sont relativement faibles. Cependant, comme pour la note d'état, cette

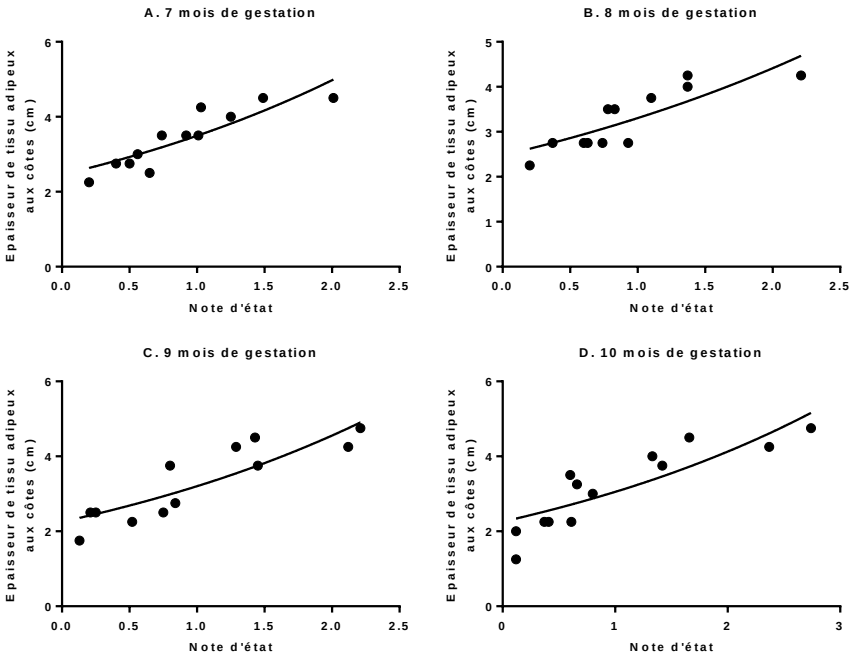


Figure C.14. Corrélation entre la mesure d'épaisseur de tissu adipeux sous-cutané aux côtes mesurée par échographie et la note d'état chez des juments gestantes en fonction du stade de gestation

A. 7ème mois de gestation (r^2=0,83, p<0,0001). B. 8ème mois de gestation (r^2=0,86, p<0,0001). C. 9ème mois de gestation (r^2=0,76, p<0,0001). D. 10ème mois de gestation (r^2=0,86, p<0,0001).

méthode de mesure par échographie était capable de distinguer une diminution de la quantité de tissu-adipeux (Figure C.14 F). Dans le cas présent, elle ne semble toutefois pas être une méthode plus sensible.

Les échographies réalisées au niveau des côtes sont mieux corrélées à la note d'état (Figure C.15). La corrélation était de r^2=0,83 ($p<0,0001$) à 7 mois de gestation, de r^2=0,77 ($p<0,0001$) à 8 mois de gestation, de r^2=0,76 ($p<0,0001$) à 9 mois de gestation et de r^2=0,86 ($p<0,0001$) à 10 mois de gestation. La mesure de tissu adipeux sous cutané au niveau des côtes semble être un indice mieux corrélé à la note d'état que la mesure du tissu adipeux sous cutané au niveau de la croupe. Il semble donc que l'estimation de la quantité de tissu adipeux au niveau des côtes soit plus évidente que celle au niveau de la croupe. Cette différence est certainement due à la présence de groupes musculaires développés à la croupe, biaisant ainsi l'estimation de l'état corporel.

Dans les deux cas, l'avancée de la gestation n'altère par la corrélation entre la NE et la mesure par échographie. Ainsi, soit la mesure par échographie à ces points anatomiques est également altérée par le changement de conformation de la jument, soit ces points anatomiques sont représentatifs du stockage et de l'utilisation des réserves lipidiques chez la jument au cours de la gestation.

En conclusion, la mesure de l'épaisseur du tissu adipeux sous cutané par échographie au niveau de la croupe permet de distinguer les chevaux à conformation atypique et donc la part du développement musculaire et du développement adipeux dans la notation de l'état corporel. La mesure de l'épaisseur du tissu adipeux sous cutané par échographie au niveau de la côte est mieux corrélée à la note d'état globale que la mesure à la croupe.

Que ce soit à la croupe ou au niveau des côtes, ces mesures sont très reproductibles entre les mesures et les examinateurs et sont capables de distinguer une diminution d'état corporel chez les individus. Il serait alors intéressant pour poursuivre cette étude de mettre en place :

- La mesure de l'épaisseur du tissu adipeux sous-cutané pour un animal donné sur plusieurs points anatomiques (croupe, côte, autre point anatomique à définir) pour obtenir une évaluation globale de la quantité de tissu adipeux chez l'animal
- La corrélation entre ces différentes mesures et des paramètres métaboliques tels que la résistance à l'insuline, la leptinémie et l'adiponectinémie par exemple.

Partie D : Bilan, discussion et perspectives

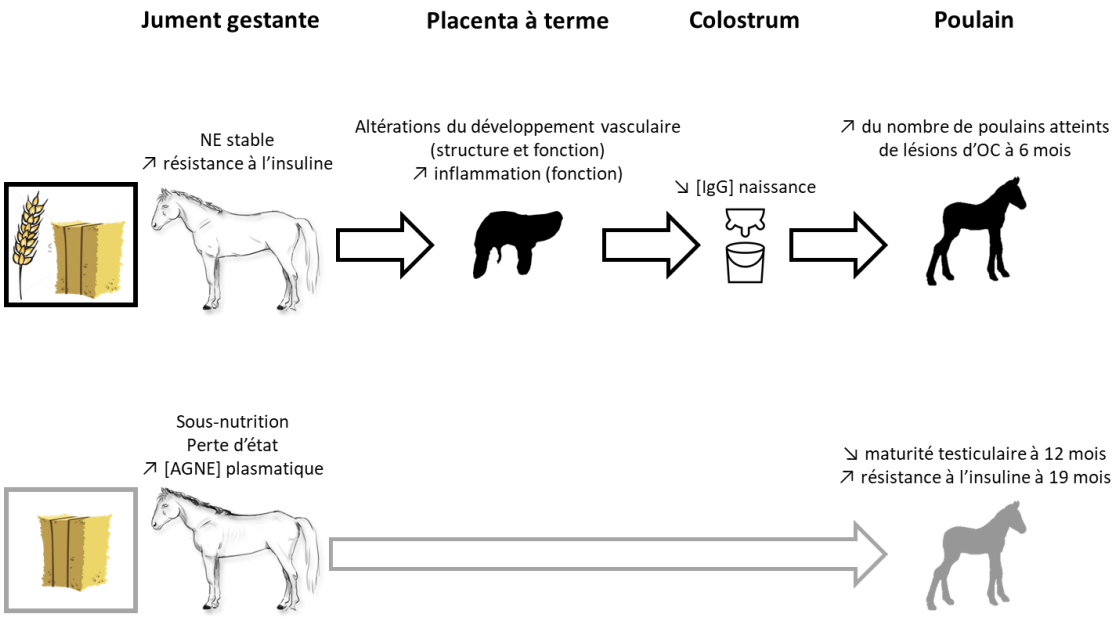


Figure D.1. Résumé des principaux résultats observés pour le modèle 1

- Les juments dont la ration était supplémentée avec des concentrés ont maintenu une note d'état corporel (NE) stable en gestation mais étaient plus résistantes à l'insuline en fin de gestation. Cette altération métabolique était associée à des altérations structurales et fonctionnelles de la vascularisation placentaire et à une augmentation de l'inflammation placentaire. A la naissance, ces juments produisaient un colostrum moins riche en immunoglobulines G (IgG). A 6 mois, plus de poulains nés de ces juments présentaient de lésions d'ostéochondrose (OC).
- Les juments qui n'ont ingéré que des fourrages au cours de la gestation étaient en sous-nutrition à mi gestation (perte d'état + augmentation des marqueurs de lipomobilisation (acides gras non estérifiés (AGNE)). Leurs poulains avaient une maturité testiculaire retardée à 12 mois et étaient plus résistants à l'insuline à 19 mois que les poulains dont les mères avaient reçu des concentrés.

1. Synthèse des résultats

L'objectif de ce travail de thèse était d'explorer les effets du métabolisme maternel durant la gestation par le biais de trois approches différentes sur le développement placentaire à terme, la croissance, le métabolisme énergétique, la maturation testiculaire et la santé ostéoarticulaire des poulains jusqu'à la deuxième année.

1.1. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante

Un schéma récapitulatif des observations réalisées pour le modèle 1 est présenté en Figure D.1.

Ce modèle avait pour objectif de perturber le métabolisme de la jument gestante en supplémentant la ration avec des céréales. Pauline Peugnet, lors de son doctorat, avait montré que les juments ayant reçu des concentrés en fin de gestation avaient une augmentation de la résistance à l'insuline en comparaison des juments n'ayant ingéré que des fourrages au cours de la gestation (Peugnet *et al.*, 2015). Cette augmentation de la résistance à l'insuline induite par l'alimentation a été accompagnée :

- d'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation placentaire et d'altérations du développement vasculaire placentaire (structure et fonction),
- d'une diminution de la concentration du colostrum en immunoglobulines G à la naissance,
- d'une augmentation de la tolérance au glucose à 3j, disparue à 6 mois et d'une augmentation du nombre de poulains atteints de lésions d'ostéochondrose à 6 mois (Peugnet *et al.*, 2015).

En parallèle, la sous-nutrition maternelle observée au cours de la gestation (perte d'état corporel, augmentation de la concentration en acides gras non estérifiés (AGNE), considérés comme marqueurs de lipomobilisation (González *et al.*, 2011) est accompagnée :

- d'une augmentation de la résistance à l'insuline des poulains à 19 mois,
- d'un retard de maturité de la fonction testiculaire chez les poulains mâles à 12 mois.

Enfin, une surnutrition entre 20 et 24 mois à hauteur de 135/140% des besoins a entrainé chez les poulains :

- une augmentation importante du poids associée à une augmentation de la quantité de tissu adipeux,
- une altération des paramètres métaboliques, principalement chez les poulains nés de juments supplémentées avec des concentrés au cours de la gestation.

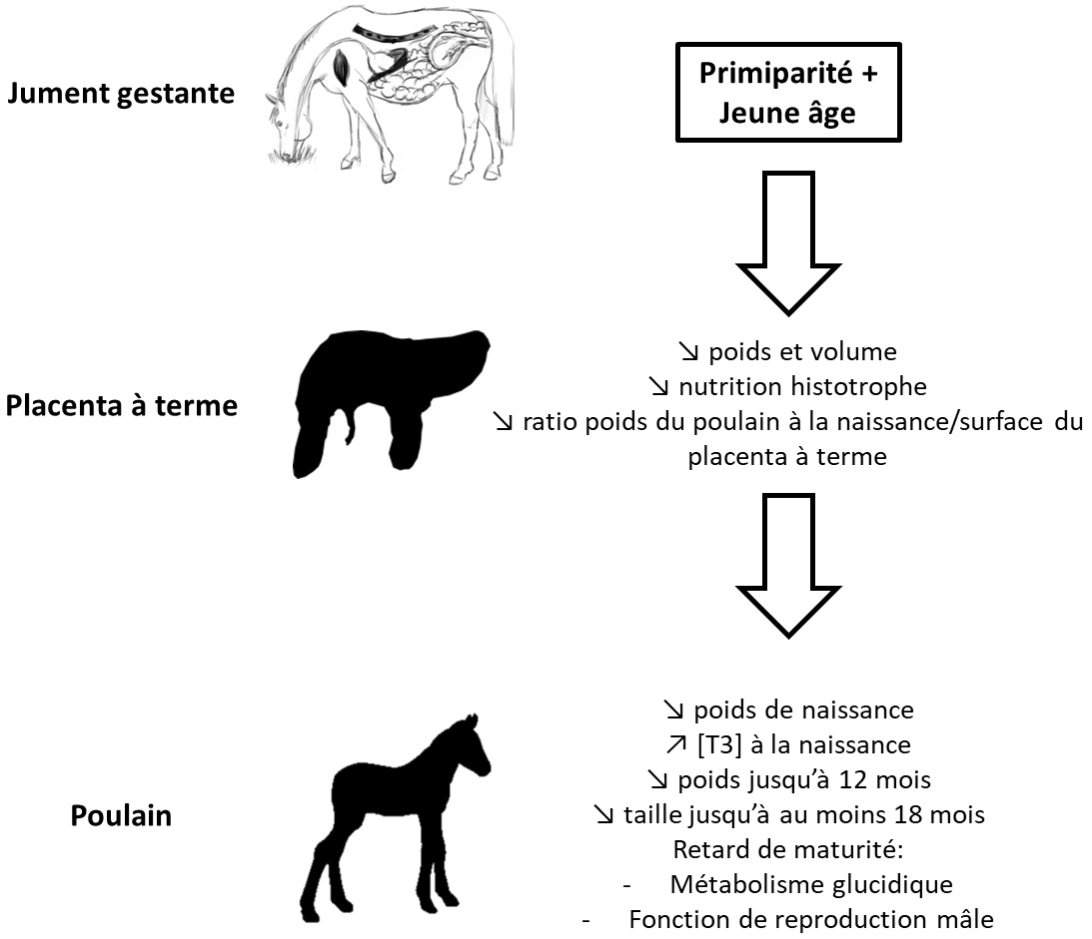


Figure D.2. Résumé des principaux résultats observés pour le modèle 2

Par rapport aux juments multipares, les juments primipares ont produit :

- à terme des placentas plus légers et moins volumineux avec une diminution du volume et de la surface des structures impliquées dans la nutrition histotrophe ainsi qu'une diminution du ratio poids du poulains à la naissance/surface du placenta à terme,
- à terme des poulains en retard de croissance intra utérin (objectivé par un poids inférieur au 10ème percentile de la population de référence (multipares) et par une augmentation de la concentration plasmatique en triiodothyronine (T3) à la naissance),
- des poulains plus légers jusqu'à 12 mois et plus petits jusqu'à au moins 18 mois,
- des poulains avec un retard dans la maturité des fonctions de métabolisme glucidique et de reproduction mâle.

En conclusion, l'apport en concentrés dans la ration maternelle altère la fonction et la structure placentaire ainsi que la santé ostéoarticulaire des poulains durant la croissance. La sous-nutrition maternelle entraine quant à elle un retard de maturité et des altérations métaboliques qui pourraient avoir des effets délétères sur les performances sportives et de reproduction par la suite.

1.2. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle

Un schéma récapitulatif des observations réalisées pour le modèle 2 est présenté en Figure D.2.

Ce protocole avait pour objectif de modéliser l'effet d'une sous-nutrition fœtale conduisant à un retard de croissance intra-utérin en comparant le développement de poulains issus de juments primipares ou multipares.

En comparaison avec les juments multipares, en ce qui concerne le développement placentaire, les primipares :

- produisaient un placenta plus léger et moins volumineux à terme,
- avaient une diminution du volume et de la surface des structures principalement impliquées dans la nutrition histotrophe à terme,
- avaient un ratio poids du poulain à la naissance/surface du placenta réduit.

De plus, les poulains nés de juments primipares :

- étaient plus petits et plus légers à la naissance et avaient une concentration plasmatique en triiodothyronine plus élevée à la naissance (comme observé dans le cas de poulains dysmatures (Peugnet *et al.*, 2014)),
- restaient plus légers jusqu'à 12 mois et plus petits jusqu'à au moins 18 mois
- présentaient un retard de maturité des systèmes de régulation de l'homéostasie glucidique et de la fonction de reproduction mâle

En conclusion, les juments primipares produisent des poulains plus légers jusqu'à 12 mois, plus petits jusqu'à au moins 18 mois et avec des retards de maturité des fonctions métaboliques et de reproduction jusqu'au au moins 12 mois. Ces différences étaient associées avec un développement placentaire diminué et une fonction de nutrition histotrophe altérée et un ratio poids du poulain/surface du placenta réduit.

1.3. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle

Un schéma récapitulatif des observations réalisées pour le modèle 3 est présenté en Figure D.3.

Ce modèle avait pour objectif d'étudier le surpoids/obésité chez la jument gestante.

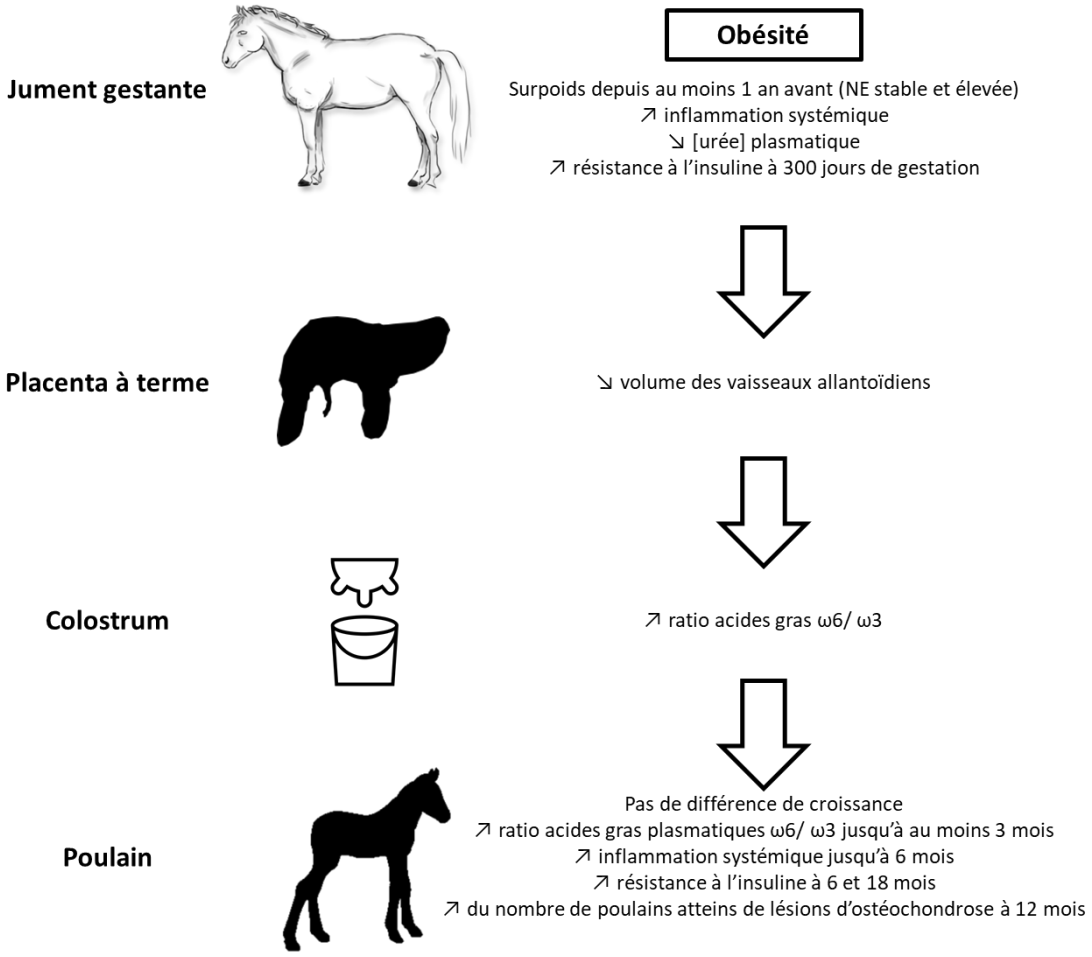


Figure D.3. Résumé des principaux résultats observés pour le modèle 3

En comparaison avec des juments normales, les juments obèses, caractérisées par une note d'état élevée depuis au moins 1 an avant l'insémination, une diminution des concentrations plasmatiques d'urée et une diminution de l'inflammation systémique au cours de la gestation ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline en fin de gestation produisaient :

- à terme des placentas avec un volume des vaisseaux allantoïdiens diminué,
- à la naissance un colostrum plus riche en acides gras omégas 6,
- à la naissance des poulains avec un plasma plus riche en acides gras pro-inflammatoires, moins riche en acides gras anti-inflammatoires
- des poulains plus résistants à l'insuline à 6 et 18 mois
- plus de poulains atteints de lésions d'ostéochondrose à 12 mois

Durant la gestation, par rapport aux juments normales, les juments obèses présentaient :

- une altération du métabolisme azoté (diminution de la concentration plasmatique en urée),
- une altération du métabolisme lipidique (augmentation de la leptinémie et diminution de l'adiponectinémie),
- une augmentation de l'inflammation systémique (augmentation de la concentration plasmatique en sérum amyloïde A),
- une augmentation de la résistance à l'insuline à 300 jours de gestation.

L'obésité était associée à des altérations du développement vasculaire des vaisseaux allantoïdiens dans le placenta à terme. A la naissance, les juments obèses produisaient un colostrum enrichi en acides gras ω-6 et en acide palmitique (pro-inflammatoires) et appauvri en acides gras ω-3 (anti-inflammatoires).

Durant la croissance, les poulains des juments obèses avaient :

- à la naissance : un plasma enrichi en acides gras ω-6 et en acide palmitique (pro-inflammatoires) et appauvri en acides gras ω-3 et en acides gras anti-inflammatoires
- jusqu'à l'âge de 3 mois : un plasma enrichi en acides gras ω-6 et appauvri en acides gras ω-3,
- une augmentation de l'inflammation systémique jusqu'à 6 mois (augmentation de la concentration plasmatique en sérum amyloïde A),
- une augmentation de la résistance à l'insuline à 6 et 18 mois,
- une augmentation de la prévalence de lésions d'ostéochondrose à 12 mois.

En conclusion, en comparaison avec des juments de note d'état normale, les juments obèses étaient résistantes à l'insuline, avec une inflammation systémique augmentée. Elles produisaient des poulains résistants à l'insuline, plus à risque de développer des lésions d'ostéochondrose et qui présentaient un profil en acide gras plasmatiques pro-inflammatoires associé avec une augmentation de l'inflammation systémique.

1.4. Synthèse générale

En conclusion, ces trois différents modèles de perturbation métabolique de l'environnement maternel au cours de la gestation confirment :

- La relation entre l'augmentation de la résistance à l'insuline maternelle, le développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains en croissance (modèle 1 et modèle 3),
- La relation entre l'inflammation maternelle et placentaire et le développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains en croissance (modèle 1 et modèle 3),

- L'effet de la sous-nutrition *in utero* sur le retard de maturité de la fonction de reproduction mâle (modèle 1 et modèle 2).
- L'importance de la primiparité dans le développement post-natal chez le poulain.

2. Limites des modèles

2.1. Limites générales

Une première limite générale concernant les différents protocoles mis en place ici est la méconnaissance du statut ostéoarticulaire des juments et de l'étalon de chaque saison de reproduction. En effet, comme présenté en introduction (*cf*. Chapitre 4, 4.2.2.), l'ostéochondrose a également une origine génétique. Il est donc impossible de savoir si les juments étaient également réparties dans les lots en termes de lésions ostéoarticulaires. Cependant, comme présenté ci-dessus et comme observé dans d'autres études (Caure et Lebreton, 2004; Vander Heyden *et al.*, 2013), il semble que le métabolisme maternel ait une influence plus importante que la génétique dans le développement de cette pathologie chez les poulains puisque quelque soient la race ou l'étude, la relation résistance à l'insuline maternelle/développement d'ostéochondrose chez le poulain est observée.

Une deuxième limite générale correspond à la conduite des juments. Dans de nombreux élevages, la qualité/surface des pâtures n'est pas suffisante pour que les juments gestantes et allaitantes maintiennent une note d'état corporelle optimale au cours de la gestation et de la lactation. Les juments sont donc généralement supplémentées avec des céréales durant la lactation, auxquels les poulains ont en général également accès. Cette pratique pourrait modifier la qualité/quantité de lait produit et entrainer des altérations phénotypiques des poulains qui n'ont pas pu être explorés dans cette thèse.

Enfin, les juments sont habituellement réinséminées au cours des les chaleurs de lait ou plus tard, pendant la lactation. Dans la station expérimentale de Chamberet, les juments ne sont mises à la reproduction qu'une année sur deux et nous n'avons donc pas pu évaluer l'effet de l'alimentation et du métabolisme en gestation sur la reprise des chaleurs ou encore sur la gestation suivante. Ainsi, il n'est pas possible de savoir si la sous-nutrition des juments du modèle 1 a altéré leur cycle œstral après la mise-bas ou si cette sous-nutrition gestationnelle aurait eu un effet sur leur métabolisme au cours de la gestation suivante.

2.2. Modèle 1 : Apport de concentrés dans la ration de la jument gestante

2.2.1. Effets confondus de la sous-nutrition et de la qualité de l'alimentation

Dans ce premier modèle, les juments ayant ingéré uniquement des fourrages ont perdu de l'état jusqu'au poulinage. Cette perte d'état était associée à une augmentation de la concentration plasmatique en AGNE. Ces juments étaient donc en sous-nutrition modérée (car la perte d'état n'a pas été trop importante). Une première limite de ce modèle est donc notre incapacité à distinguer les effets de la sous-nutrition maternelle des effets de la qualité de l'énergie sur le développement des poulains :

- Doit on considérer le groupe de juments du lot "fourrage", qui a perdu de l'état, ou le groupe "concentré", qui a maintenu son état, comme groupe témoin?
- La résistance à l'insuline augmentée chez les poulains nés des juments du lot fourrage est-elle due à la sous-nutrition maternelle, comme ce qui est observé dans d'autres espèces ? Ou les poulains issus des juments ayant reçu des concentrés sont-ils plus sensibles à l'insuline jusqu'à 19 mois ?
- Observe-t-on un retard de maturité testiculaire chez les poulains nés de juments sous-nourries ou la supplémentation en concentrés accélère-t-elle la maturation des gonades ?

Cavinder et ses collaborateurs, qui ont comparé un groupe de jument (Quarter Horse) conduites en pâture et un groupe de jument supplémentées avec des concentrés (sorgho et tourteaux de soja) à partir du 6ème mois de gestation n'ont également pas pu distinguer ces effets confondants (Karren *et al.*, 2010; Thorson *et al.*, 2010; Hammer *et al.*, 2011; Cavinder *et al.*, 2012; Coverdale *et al.*, 2015). En effet, dans leur cas, les juments supplémentées ont conservé une note d'état stable au cours de la gestation, alors que les juments en pâture ont perdu de l'état au cours de la gestation pour atteindre une note d'état moyenne de 2,2 au poulinage, comme dans notre étude. En ce qui concerne la biométrie fœto-placentaire à terme et la qualité du colostrum à la naissance, ces auteurs observent les mêmes altérations que dans notre étude. Cependant, ils n'ont pas évalué le métabolisme ni la maturité des fonctions de reproduction chez les poulains. De plus, en dehors de notre travail, aucune étude n'a encore analysé l'effet de la sous-nutrition maternelle sur le métabolisme des poulains et leur maturité testiculaire. L'interprétation de nos résultats est ainsi principalement basée sur des résultats obtenus dans d'autres espèces.

Une étude a été réalisée pour observer les effets de la qualité de l'énergie (sous forme de glucides ou de lipides) distribuée à la jument au cours de la gestation sur le métabolisme des poulains (George *et al.*, 2009). La supplémentation de la ration de juments gestantes (Pur-sang Anglais) avec un concentré riche en amidon à partir du 6ème mois de gestation entraine chez le poulain une augmentation de la glycémie basale jusqu'à 80 jours, de l'insulinémie basale jusqu'à 40 jours et une diminution de la sensibilité à l'insuline à 4 mois. Il semblerait donc qu'à quantité d'énergie distribuée égale, l'enrichissement de la ration maternelle en amidon (*i.e.*, avec des céréales) durant la deuxième moitié de gestation altère la régulation de l'homéostasie glucidique chez le poulain en augmentant sa résistance à l'insuline. Ainsi, l'augmentation de la résistance à l'insuline observée chez les poulains du modèle 1 serait bien un effet de la sous-nutrition maternelle.

Cependant, certaines observations, telles que l'augmentation de lésions d'ostéochondrose en lien avec la supplémentation en concentrés confirment des observations réalisées sur le terrain : les juments ingérant des concentrés ont plus de risque de produire des poulains souffrant de lésions d'ostéochondrose (Vander Heyden *et al.*, 2013), de même que les juments résistantes à l'insuline au cours de la gestation (Caure et Lebreton, 2004).

2.2.2. Choix de la période de surnutrition chez la descendance

Comme présenté dans l'introduction (cf. Introduction générale), en France, beaucoup de chevaux sont vendus autour de l'âge d'1 an. Ils sont donc préparés entre 6 mois et 1 an, juste après le sevrage, dans l'objectif d'être bien développés et de donner envie aux acheteurs d'acquérir le poulain.

Nous avons surnourri les poulains entre 20 et 24 mois dans l'objectif de mimer cette préparation aux enchères. La surnutrition était donc trop tardive pour représenter exactement les pratiques d'élevage. De plus, comme présenté en introduction (*cf*. Chapitre 4, paragraphe 4.2.1.), l'ostéochondrose est une maladie qui se stabilise à environ 1 an et demi. Dans le cas présent, la surnutrition est survenue trop tard pour avoir eu un quelconque effet sur le développement de cette affection.

L'intérêt principal de cette surnutrition tardive a donc été de vérifier si la mise en déséquilibre alimentaire en période post-natale après un déséquilibre en période anténatale permettait de révéler un phénomène de programmation *in utero* ("second hit") (Gluckman et Hanson, 2004b). Nous avons effectivement démontré une réponse métabolique différente entre les deux lots d'animaux.

2.2.3. Méthode d'alimentation des poulains

Enfin, lors des périodes d'hivernage les poulains ont été nourris avec un distributeur automatique de concentrés (DAC). Le DAC a été réglé de telle manière à ce que les poulains reçoivent 1/8 de leur ration

toutes les 4 heures. Ainsi, ils avaient accès à leur ration de concentrés en 8 repas différents entre 6 et 12 mois et entre 19 et 24 mois. Très peu d'éleveurs possèdent un DAC. Dans la majorité des élevages, les concentrés sont distribués en deux repas, parfois en trois au cours de la journée. Le DAC est un outil très utile dans le cadre de la recherche. Il permet de pouvoir faire un suivi de consommation précis et individualisé, de gérer la prise alimentaire des animaux, mais n'est pas représentatif des pratiques d'élevages.

Il est alors possible que la prévalence d'ostéochondrose observée dans nos lots ait été modifiée par l'utilisation du DAC. En effet, il a déjà été démontré que le développement de lésions d'ostéochondrose est associé à une hyperinsulinémie post-prandiale importante (Carlsten *et al.*, 1993a; Pagan *et al.*, 2001). Fractionner l'apport de concentrés en plusieurs petits repas plutôt qu'en 2 gros repas devrait théoriquement diminuer les concentrations plasmatiques en glucose et en insuline post-prandiaux et pourrait réduire l'incidence des lésions d'ostéochondrose chez les poulains.

Pour conclure, les trois limites principales de ce modèle sont :

- **L'incapacité à distinguer les effets de la sous-nutrition des effets de la qualité de l'énergie distribuée sur le développement des poulains**
- **La surnutrition effectuée trop tardivement pour mimer réellement les pratiques d'élevages et observer un effet sur le développement ostéoarticulaire**
- **L'utilisation d'un distributeur automatique de concentrés, qui peut avoir des effets sur le développement ostéoarticulaire et n'est pas utilisé en élevage.**

2.3. Modèle 2 : Effet de la parité maternelle

La limite principale de ce modèle est la confusion entre l'âge et la parité des juments. Bien qu'en termes généraux, la parité et l'âge sont en général colinéaires au sein des élevages, il arrive que les juments commencent leur carrière de poulinière après une carrière sportive et se retrouvent donc primipares à un âge « avancé ». Dans le cas présent, toutes les juments primipares étaient âgées de 4 à 5 ans tandis que les juments multipares avaient plus de 6 ans. En comparant le poids de naissance de poulains issus de juments multipares âgées de 4 à 9 ans ou de plus de 9 ans, Wilsher et Allen (2003) ont observé que les poulains des jeunes juments Pur-sang Anglais naissaient moins lourds que les poulains des juments plus âgées. D'autre part, Elliott et al., (2009) ont observé que la parité avait une influence plus importante que l'âge sur le développement *in utero* des poulains. Aucune donnée n'est disponible sur le développement post-natal des poulains. Il est alors possible que le retard de maturité important observé chez les poulains nés de juments primipares puisse avoir été renforcé par la différence d'âge entre les juments des deux groupes.

Pour conclure, la limite principale de ce modèle est la confusion entre l'âge et la parité des juments.

2.4. Modèle 3 : Effet de l'obésité maternelle

2.4.1. Surpoids et obésité

Les juments de ce modèle ont été caractérisées comme obèses mais leur note d'état au cours de la gestation était stabilisée à environ 4 sur une échelle de 1 à 5. D'après la grille développée par l'INRA, l'IFCE et l'institut de l'élevage (Arnaud *et al.*, 1997b), un cheval est considéré comme en surpoids avec une note d'état de 4 et obèse lorsque sa note d'état atteint 5. Les juments du présent protocole devraient donc, selon cette grille, être catégorisées comme en surpoids. Cependant, il n'y a à ce jour pas de consensus en ce qui concerne le point à partir duquel un cheval peut être considéré comme obèse. D'après l'OMS, l'obésité est définie chez l'humain comme *« une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé* » (World Health Organization, 2000). Dans le cas présent, bien que les juments ne soient pas considérées comme obèses sur l'échelle de note d'état française, elles présentent une augmentation de la résistance à l'insuline, de l'inflammation systémique et une diminution de la concentration plasmatique en urée habituellement observés dans les cas d'obésité ou de surnutrition dans les autres espèces (Barber *et al.*, 1985; He *et al.*, 2012). De plus, ces juments avaient une note d'état corporelle stable l'année précédant leur insémination et durant leur gestation. Cette perte de la variation de la note d'état corporel des chevaux alors que les apports nutritionnels ne sont pas constants (pâture) est associée à la définition d'obésité dans cette espèce (Giles *et al.*, 2012, 2014).

Enfin, au moment de l'insémination, les deux lots de juments avaient été mis en pâture les semaines précédant la mise à la reproduction. A cette période de l'année, avec une bonne qualité et quantité d'herbe produite, les juments ont vu leur note d'état augmenter, à la manière du « flushing » souvent effectué chez les ruminants pour améliorer les performances de reproduction (Khireddine *et al.*, 1998; Scaramuzzi *et al.*, 2006). L'augmentation de la note d'état que nous avons observée était ainsi associée à la mise au pré et à la provision d'énergie assurée par l'herbe de printemps, et les deux groupes présentaient des notes d'état identiques au moment de l'insémination.

Dans d'autres régions, ou d'autres systèmes d'élevage, les juments n'ont pas toujours accès au pâturage ou bien ne sont pas inséminées au printemps. Elles ne subissent donc pas cette augmentation de stockage au sein du tissu adipeux au moment de l'insémination. Ce modèle représente donc un type d'élevage particulier.

2.4.2. Inflammation systémique et inflammation placentaire

L'inflammation systémique a été estimée en mesurant les concentrations plasmatiques en sérum amyloïde A. Le sérum amyloïde A est une protéine produite par le foie (Jacobsen et Andersen, 2007) mais également par le tissu adipeux (Sjöholm *et al.*, 2005) en réponse à une inflammation. Comme présenté dans le Chapitre 2, paragraphe 2.3., les cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-1 ou encore TNF-α sont les premiers marqueurs de l'inflammation et peuvent être produits localement par les cellules immunitaires et les adipocytes.

Pour avoir une meilleure vision d'ensemble et pouvoir conclure exactement sur le statut inflammatoire des juments et des poulains il aurait donc fallu doser ces différentes cytokines. De plus, il n'est à l'heure actuelle pas possible de confirmer que l'inflammation systémique observée chez les juments de manière transitoire correspondait également à une inflammation placentaire. Les données chez l'homme (Zaretsky *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2007; Challier *et al.*, 2008) et du modèle 1 semblent confirmer cette hypothèse, mais d'autres méthodes d'analyse telles que :

- le dosage des cytokines placentaires,
- une analyse transcriptomique de l'expression des gènes placentaires,
- une analyse histologique de la présence de cellules immunitaires par comptage cellulaire,

seraient seules à même de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une inflammation placentaire et donc sa potentielle relation avec le développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains durant la croissance.

3. Discussion et perspectives

3.1. Performance sportive et reproductive

Le suivi des poulains s'est arrêté entre 18 et 24 mois. Or, c'est à cet âge que commence réellement l'activité sportive chez les chevaux de course (Pur-sang Anglais et Trotteur Français) et à un âge plus avancé (débourrage autour de 3 ans) chez les chevaux de sport. Ainsi les observations réalisées à l'âge de 18 ou 24 mois pourraient être immédiatement transférables dans le cas de chevaux mis directement à l'exercice après les dernières analyses réalisées :

- Dans le cas de la primiparité, la plus petite taille des poulains pourrait avoir un effet négatif sur leurs performances (Dolvik et Klemetsdal, 1999; Smith *et al.*, 2006) mais également sur leur prix de vente en tant que yearlings (Pagan *et al.*, 2005).
- L'augmentation de la résistance à l'insuline observée chez les poulains nés des juments sous-nourris ou chez tous les poulains après le challenge de surnutrition est associée chez l'homme adulte à une intolérance à l'effort (Reusch *et al.*, 2013; Regensteiner *et al.*, 2015). Elle pourrait

donc entraîner une diminution des capacités sportives des poulains mis à l'entrainement à ces âges. Cependant, il est aujourd'hui largement admis que l'exercice physique augmente la sensibilité à l'insuline (Conn *et al.*, 2014) et aucune hypothèse ne peut être formulée en ce qui concerne l'évolution du métabolisme des poulains après l'entrainement.

- De plus, les altérations métaboliques sont souvent associées à des altérations de la fonction cardio-vasculaire et respiratoire (Aroor *et al.*, 2013; Laakso et Kuusisto, 2014; Paneni *et al.*, 2014). Ces aspects n'ont pas été explorés dans l'étude présente mais pourraient également affecter la performance sportive des poulains à long terme. En effet, Giussani et al., (2003) ont montré que la surnutrition ou la sous-nutrition fœtale (réalisée par transferts d'embryons) étaient associées à des altérations de la régulation de la tension artérielle dans la période néonatale.

De la même manière, le retard de maturité observé à 12 mois, alors que les poulains sont encore considérés comme prépubères (la puberté mâle commençant autour de 12 mois se terminant autour de 24 mois chez les chevaux (Clemmons *et al.*, 1995; Johnson, 1995)) ne donne pas d'information sur les performances de reproduction des futurs étalons. Si l'effet de la sous-nutrition fœtale sur le retard de maturité testiculaire et de puberté est également observé dans d'autres espèces (Da Silva *et al.*, 2001; Alejandro *et al.*, 2002; Kotsampasi *et al.*, 2009; Genovese *et al.*, 2010), très peu d'études se sont intéressées à l'effet de la sous-nutrition maternelle sur les capacités reproductives et la fertilité des animaux à l'âge adulte (pour revue : Chadio et Kotsampasi, 2014; Chavatte-Palmer *et al.*, 2014; Zambrano *et al.*, 2014). Chez le mouton et l'homme cependant, la sous-nutrition maternelle n'entraine pas de modification des paramètres utilisés pour estimer la qualité de la semence (Rae *et al.*, 2002; Painter *et al.*, 2008b). D'un autre côté, l'obésité maternelle est associée à une diminution de la fertilité mâle (Rodríguez-González *et al.*, 2015; Bautista *et al.*, 2017) et à des altérations des marques épigénétiques des spermatozoïdes (Ge *et al.*, 2014) chez les rongeurs et l'homme. De plus, deux poulains (soit 29% du groupe) présentaient un testicule cryptorchide dans le lot obèse alors qu'aucune anomalie n'a été observée chez les poulains nés de juments normales. La différence n'est pas différente statistiquement (p=0,12, test de Khi2) mais avec si peu d'individus par lot (n=7), la puissance de ce test est trop faible (11%).

La fertilité des femelles n'a pas été suivie ici. Chez la brebis, les effets de la sous-nutrition maternelle sont contrastés. En fin de gestation, la sous-nutrition maternelle n'affecte pas le taux d'ovulation à l'âge adulte (Gunn *et al.*, 1995) alors qu'appliquée depuis l'insémination jusqu'à 95 jours de gestation (soit jusqu'aux 2/3 de la gestation), elle diminue le taux d'ovulation à l'âge adulte (Rae *et al.*, 2002). Dans l'espèce bovine, il a aussi été montré qu'une sous-nutrition maternelle dans le premier tiers de la gestation réduisant significativement la quantité de follicules antraux dans l'ovaire des descendantes

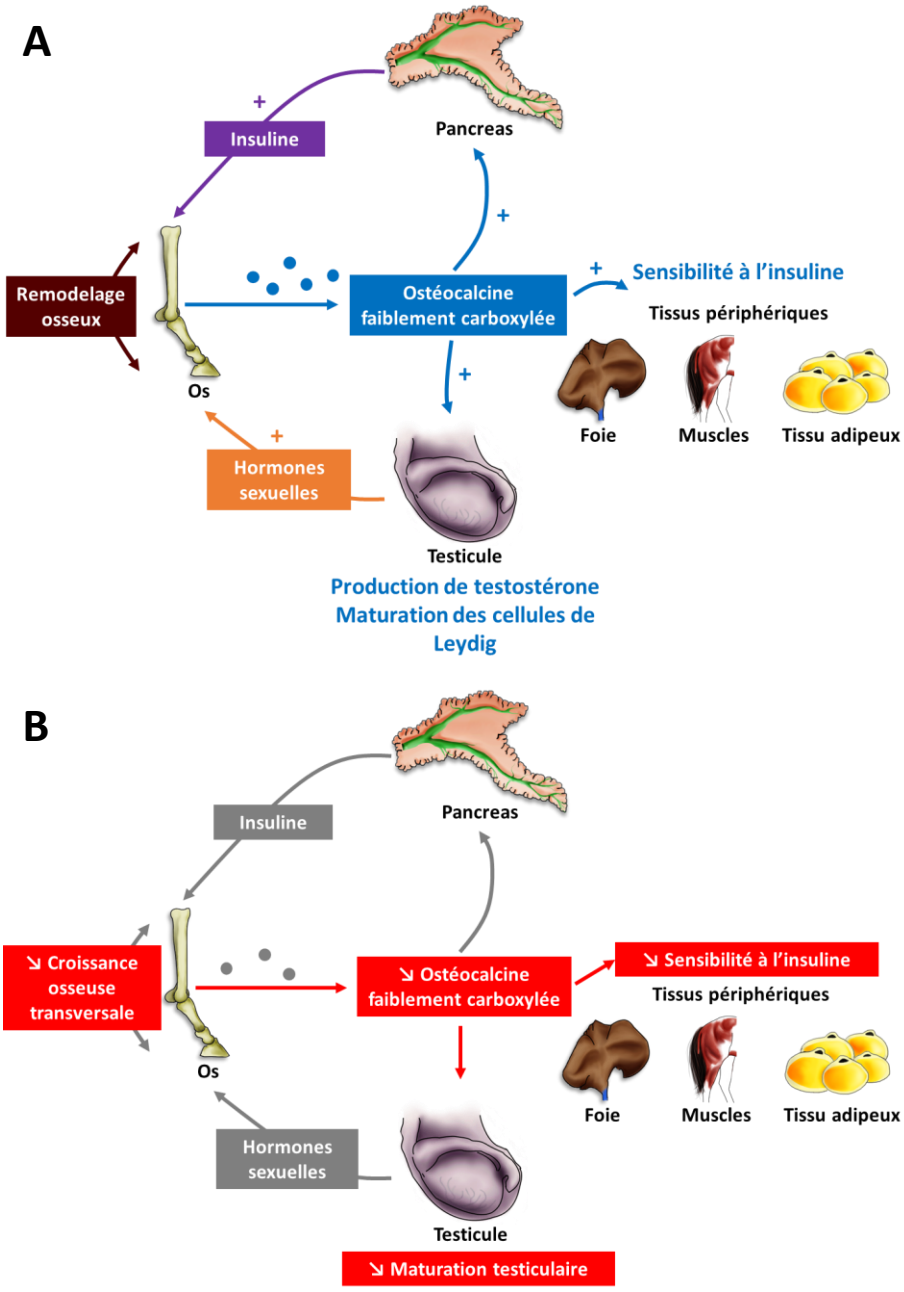


Figure D.4. Hypothèse de mécanisme physiologique proposée pour le modèle 1

A. Schéma explicatif de l'interrelation entre le métabolisme glucidique, le métabolisme osseux et le métabolisme testiculaire via les actions multiples de l'ostéocalcine.

B. Hypothèse émise pour expliquer les altérations métaboliques observées chez les poulains nés de juments sous-nourries en gestation.

(Mossa *et al.*, 2013), cette réduction du nombre de follicule antraux étant associée à une réduction de la fertilité des animaux (Mossa *et al.*, 2012). Enfin, chez la souris, l'obésité maternelle induite par la surnutrition entraine une réduction de la réserve ovarienne, une réduction des follicules primordiaux, antraux et de Graaf ainsi qu'une augmentation des gènes impliqués dans l'apoptose dans les ovaires (Cheong *et al.*, 2014; Aiken *et al.*, 2016). Ces données indiquent qu'une sous-nutrition maternelle ou une obésité maternelle pourraient réduire les performances de reproduction chez les femelles.

En conclusion, le métabolisme maternel peut donc affecter les performances sportives et de reproduction de la descendance. Pour confirmer ces hypothèses il serait intéressant :

- d'avoir un suivi des chevaux à plus long terme,
- d'étudier la réponse à l'effort des animaux (fonctions cardio-vasculaires et respiratoires, interaction métabolisme maternel x exercice sur le métabolisme glucidique)
- d'étudier la fertilité des poulains à l'âge adulte.

3.2. Mécanismes physiologiques et épigénétiques sous-jacents

3.2.1. Mécanismes physiologiques

3.2.1.1. Relations entre les différents métabolismes

Les modifications phénotypiques observées chez les poulains issus de juments sous-nourries (modèle 1) peuvent être expliquées par l'interaction entre les différents acteurs du métabolisme énergétique (*cf.* introduction, Chapitre 2). Un schéma récapitulatif des hypothèses exposées est présenté en Figure D.4.

L'action positive de l'insuline sur le remodelage osseux (Ferron *et al.*, 2010b; Fulzele *et al.*, 2010b) entraine la libération d'ostéocalcine faiblement carboxylée, qui a la propriété d'améliorer la sensibilité à l'insuline des muscles squelettiques, du foie et du tissu adipeux ainsi que la production d'insuline par les cellules β-pancréatiques (Karsenty, 2011b). La résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose sont associés avec des concentrations sériques en ostéocalcine faible (Ducy, 2011). Dans le modèle 1, les poulains nés des juments sous-nourries tendaient à avoir une tolérance au glucose et une concentration sérique en ostéocalcine diminuées à l'âge de 3 jours (Peugnet *et al.*, 2015). A 19 mois, ces poulains étaient plus résistants à l'insuline. D'après les observations réalisées dans d'autres espèces, il est possible que la résistance à l'insuline de ces poulains soit corrélée à une diminution de la concentration sérique en ostéocalcine autour de 19 mois en conséquence de la boucle de régulation entre les métabolismes glucidiques et osseux. L'augmentation de la résistance à l'insuline pourrait alors induire une diminution du remodelage osseux chez les poulains nés de juments sous-nourries et donc de la croissance osseuse. Cette hypothèse est confortée par le fait que nous avons observé que

les canons étaient moins épais chez les poulains du groupe "concentrés" par rapport au groupe "fourrage". Enfin, il a été également montré que l'ostéocalcine stimule la sécrétion de testostérone chez l'homme et la souris *in vivo* et *in vitro* et joue un rôle dans la maturation des cellules de Leydig (Lee *et al.*, 2007; Karsenty, 2011a; Oury *et al.*, 2011; Karsenty et Oury, 2014). L'interaction entre les différentes boucles de régulation des métabolismes glucidiques, osseux et testiculaires pourrait ainsi expliquer les différentes altérations phénotypiques observées chez les poulains nés de juments sous-nourries.

Dans le modèle 2, le retard de maturation des fonctions de régulation de l'homéostasie glucidique et de reproduction chez les poulains nés de juments primipares semble principalement lié au retard de croissance intra utérin observé à la naissance et donc au retard de maturité observé dès la naissance.

Enfin, les poulains du modèle 3, bien qu'ayant une inflammation systémique et une résistance à l'insuline augmentées ne présentent pas de différence de maturation testiculaire ni de croissance osseuse. Il est possible que la fenêtre d'observation de la maturation testiculaire ait été trop précoce, que les effets apparaissent plus tardivement sur la production de testostérone et la qualité de la semence ou qu'il n'y ait simplement pas d'effet (Rodríguez-González *et al.*, 2015; Bautista *et al.*, 2017). De plus, l'absence de différence dans les mensurations osseuses ne traduit pas la qualité de l'os et sa densité, même si une augmentation de la largeur des canons est associée avec une augmentation de la minéralisation osseuse et de la résistance à la rupture chez le cheval (Sherman *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 2001). Ainsi, l'absence d'information quant à la densité osseuse et au développement testiculaire à la fin de la puberté ne nous permet pas de poser des hypothèses semblables à celles du modèle 1.

3.2.1.2. Métabolisme maternel, inflammation placentaire et développement d'ostéochondrose chez le poulain

La résistance à l'insuline et l'inflammation systémique sont intrinsèquement liées (*cf*. Chapitre 2, paragraphe 2.3). De plus, chez la femme, la résistance à l'insuline est associée à une augmentation de l'inflammation placentaire (Radaelli *et al.*, 2003; Challier *et al.*, 2008; Enquobahrie *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2011; Saben *et al.*, 2013, 2014; Hayes *et al.*, 2014; Altmäe *et al.*, 2017). D'après les résultats des modèles 1 et 3, il semblerait que l'inflammation placentaire, au même titre que la résistance maternelle à l'insuline, conduise au développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains. Bien que l'ostéochondrose ne soit pas une pathologie d'origine inflammatoire (Ytrehus *et al.*, 2007), il a été montré que les leucocytes des chevaux atteins d'ostéochondrose présentaient une altération de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation (Serteyn *et al.*, 2010) tels que *MGAT4A* (expression augmentée) qui est impliqué dans la synthèse des N-glycans, composants des

glycoprotéines telles que les protéines de phase aigüe (*i.e*. SAA, protéines du complément) (Connelly *et al.*, 2016).

Chez le rat, l'ajout de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-1) dans le milieu de culture d'os métatarsiens augmente la production d'IL-6 et la croissance des os fœtaux. L'augmentation de la concentration en facteurs pro-inflammatoires dans l'environnement osseux entraine une augmentation de l'expression d'IL-6 par le cartilage de croissance et une diminution de la croissance osseuse (Fernandez-Vojvodich *et al.*, 2013). Ainsi, l'inflammation maternelle pourrait entrainer une augmentation de l'inflammation locale, associée à un retard de maturation des chondrocytes durant la vie *in utero*. Ces altérations pourraient donc par la suite conduire au développement de lésions d'ostéochondrose, d'autant plus si l'environnement post-natal est délétère.

Des travaux sont donc encore à compléter pour déterminer si le métabolisme glucidique maternel seul, l'inflammation placentaire seule ou la synergie des deux métabolismes est à l'origine des défauts de maturation des articulations des poulains. La question des mécanismes sous-jacents de ces observation se pose également.

3.2.2. Mécanismes transcriptionnels et épigénétiques

Les observations phénotypiques réalisées chez les poulains ont une origine transcriptionnelle et épigénétique.

3.2.2.1. Facteurs de transcription

La résistance à l'insuline est régulée par plusieurs facteurs de transcription tels que Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) et FOXO1 (Forkhead box O1) (liste non exhaustive) (Kang *et al.*, 2016; Rosen, 2016).

PPARγ est un récepteur nucléaire qui est la cible des thiazolidinediones, médicaments utilisés dans le cas du diabète de type 2. Ce récepteur nucléaire contrôle les fonctions de métabolisme glucidique, métabolisme lipidique, survie et prolifération cellulaire, sensibilité à l'insuline et stress oxydatif (Fang *et al.*, 2016). Chez le mouton, une sous-nutrition maternelle durant la période d'hépatogénèse (de 30 à 80 jours de gestation) associée à une surnutrition de l'agneau après le sevrage entraine une accumulation de triglycérides hépatiques. Ces altérations phénotypiques sont associés à une augmentation de l'expression de *PPARγ* et de son coactivateur *PPARγ co-activator 1α* (*PGC1α*) dans le foie des agneaux (Hyatt *et al.*, 2011). Chez le rat, la surnutrition maternelle durant la gestation entraine une augmentation de l'expression de *PPARγ* dans le tissu adipeux associée avec une augmentation de

la glycémie, de l'insulinémie et de la triglycéridémie à jeun ainsi qu'à une augmentation de la quantité de tissu adipeux chez les descendants mâles à 9 mois (Desai *et al.*, 2015).
FOXO1 est également impliqué dans la régulation de la sensibilité à l'insuline puisqu'il est une cible de la voie de signalisation activée par la liaison de l'insuline à son récepteur. Chez le mouton, une sous-nutrition maternelle durant la majorité de la gestation entraine une diminution de l'expression musculaire de *FOXO1* à 3 mois associée à une augmentation de la phosphorylation d'Akt et une diminution du pourcentage d'accumulation lipidique musculaire (Reed *et al.*, 2014).

Ainsi les modifications de l'environnement maternel pourraient affecter l'expression des gènes impliqués dans les différentes fonctions métaboliques par la dérégulation de l'expression ou de l'activité des facteurs de transcription.

3.2.2.2. Mécanismes épigénétiques

Les mécanismes épigénétiques tels que les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et les ARN non codant peuvent modifier l'expression génique. En général, la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur des gènes entraine une fermeture de la chromatine et s'accompagne d'une réduction de la transcription du gènes alors que l'acétylation des histones est corrélée à une augmentation de l'expression des gènes et à l'ouverture de la chromatine (Jammes *et al.*, 2011). Les miR sont des petits ARN non codants qui entrainent la répression de la translation ou une dégradation de l'ARNm (Cai *et al.*, 2009).

Autour du terme, les fœtus macaques descendant de mères surnourries avec un régime riche en lipides présentent une hyperacétylation de l'histone H3 (H4K14, H3K9 et H3K18 (K=lysine)) au niveau hépatique associée avec une diminution de la quantité et de l'activité de l'enzyme histone désacétylase (HDAC). Ces modifications sont associées avec une altération de l'expression de gènes hépatiques impliqués dans le cycle circadien (Aagaard-Tillery *et al.*, 2008).
De la même manière, les fœtus de souris descendants de souris surnourries avec un régime riche en lipides et intolérantes au glucose présentent une augmentation hépatique de l'expression des lysines acétyltransférases impliquées dans l'acétylation des histones à 18,5 jours de gestation (Panchenko *et al.*, 2016). Ces altérations de l'expression des acteurs de la machinerie épigénétique sont associés à une modification de l'expression de la glucokinase, impliquée dans la synthèse du glycogène.
Enfin, les agneaux issus de brebis obèses présentent une augmentation hépatique des micro ARN (miR) 29b, 103 et 107 associée à une diminution de l'expression du récepteur à l'insuline, de la phosphorylation d'Akt et de FOXO1 (Nicholas *et al.*, 2013).

Ainsi l'environnement maternel peut altérer les mécanismes épigénétiques de la descendance, conduisant à des modifications du phénotype. Aucun outil n'est disponible à l'heure actuelle pour une étude systématique des marques épigénétiques dans l'espèce équine.

3.3. Comportement et apprentissage

L'obésité maternelle a été montrée comme ayant une influence négative sur le comportement de la descendance. En effet, il a été montré chez l'homme, les rongeurs et les macaques que les descendants de mères obèses sont plus nombreux à présenter des problèmes de comportement (Deardorff *et al.*, 2017) tels que l'anxiété (Bilbo et Tsang, 2010; Sullivan *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2017b), l'inattention et l'hyperactivité (Rodriguez *et al.*, 2008; Rodriguez, 2010). Chez le macaque, l'obésité maternelle est associée à une augmentation des stéréotypies chez la descendance (Thompson *et al.*, 2017b). Enfin chez l'homme, l'obésité maternelle a également été associée à une diminution des scores de développement mentaux chez les enfants (Dammann et Gressens, 2012; Casas *et al.*, 2013; Kerstjens *et al.*, 2013; Tanda *et al.*, 2013) mesurés par différents tests. Ces effets sont liés :

- à une inflammation placentaire augmentée en cas d'obésité maternelle. Cette augmentation de l'inflammation a été reliée à un développement plus important de comportement semblable à l'autisme chez la souris (Malkova *et al.*, 2012). Il semble ainsi que l'inflammation placentaire puisse se transmettre au fœtus et altérer son développement neuronal (Bale, 2015; van der Burg *et al.*, 2015). En effet, l'inflammation placentaire (induite ou pathologique) a été associée à des dommages du cerveau du nouveau-né (Leviton, 1993; Patrick et Smith, 2002; Kuypers *et al.*, 2012; Balakrishnan *et al.*, 2013).
- à une augmentation de l'inflammation du cerveau (Bilbo et Tsang, 2010; Grayson *et al.*, 2010) observée chez des rats et des macaques nés de femelles obèses,
- à une diminution de la maturation des neurones observée chez le rat (Stachowiak *et al.*, 2013).

De la même manière, l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6ω3) joue un rôle essentiel dans le développement du cerveau chez de nombreuses espèces (Dyall, 2015). Cette observation a été confirmée chez le cheval puisqu'une supplémentation en DHA de 250 jours de gestation à 74 jours de lactation améliore la mémoire à long-terme et les capacités d'apprentissage des chevaux à l'âge de 2 ans (Adkin *et al.*, 2015).

Pour rappel, les juments ayant reçu des concentrés au cours de la gestation (modèle 1) étaient insulinorésistantes en fin de gestation et avaient une augmentation de l'inflammation placentaire à terme. Les juments obèses (modèle 3) étaient insulinorésistantes en fin de gestation et avaient une

inflammation systémique augmentée au cours de la gestation. Leurs poulains quant à eux présentaient un appauvrissement de la concentration en acides gras ω-3 précurseurs du DHA.

Ainsi il est possible que les poulains nés de ces juments présentent des altérations du comportement et/ou de la mémoire et de l'apprentissage à l'âge adulte. Ces altérations du comportement pourraient donc rendre les chevaux moins performants.

Il serait donc intéressant de suivre le comportement des poulains issus de juments présentant de l'inflammation placentaire ou systémique (recevant des concentrés ou obèses) par :

- des tests de tempérament (Lansade *et al.*, 2016),
- des tests d'apprentissage à court et à long terme (Adkin *et al.*, 2015),
- des suivis de comportement alimentaire,
- des tests de suivi du mouvement spontané.

Afin de déterminer si, en plus d'affecter le métabolisme et le développement d'ostéochondrose chez les poulains, le métabolisme maternel pourrait également altérer leur comportement et/ou leur capacité d'apprentissage et donc contribuer à la diminution des performances sportives.

3.4. Implications pour la filière

Ce travail de thèse s'insère directement dans les problématiques de production de la filière équine. Les observations réalisées soulignent l'importance d'une bonne gestion de la jument poulinière pour la santé du poulain jusqu'à 18 ou 24 mois. Ils sont donc directement valorisables pour la filière des courses hippiques, qui commence à exploiter les chevaux à partir de 18 mois environ et transposables à la filière sport, notamment en ce qui concerne la santé ostéoarticulaire.

Ce travail peut donc conduire à la mise en place de conseils de conduite des juments gestantes et des poulains en croissance afin d'optimiser le potentiel génétique des animaux produits :

- **En gestation : Privilégier l'accès aux fourrages et éviter, si possible, les concentrés à base de céréales, riches en amidon. Si la distribution de concentrés est obligatoire, privilégier plusieurs petits repas à deux gros repas pour éviter les pics trop importants de glycémie et d'insulinémie. Complémenter avec un apport suffisant en vitamines et minéraux. Surveiller l'état corporel de la jument gestante afin d'éviter une surnutrition ou sous-nutrition au cours de la gestation (une note d'état optimale en fin de gestation se trouve entre 2,5 et 3,5). Enfin, faire perdre du poids aux juments obèses avant l'insémination afin d'éviter tout effet du surpoids sur le développement du futur poulain.**

- **<u>Pour le poulain en croissance</u> : Privilégier l'accès aux fourrages et éviter, si possible, les concentrés à base de céréales, riches en amidon. Si la distribution de concentrés est obligatoire, privilégier plusieurs petits repas à deux gros repas. Complémenter avec un apport suffisant en vitamines et minéraux. Eviter de surnourrir les poulains, une vitesse de croissance ou une quantité d'énergie reçues trop importantes peuvent altérer le métabolisme du poulain et entrainer une augmentation du risque de développer des lésions d'ostéochondrose.**

4. Conclusion

La complexité des interactions métaboliques ainsi que l'état des connaissances concernant l'effet de l'environnement maternel sur le développement des poulains ont été développés en introduction de ce travail. Les observations et résultats apportés par cette thèse confirment et poursuivent les travaux au préalable réalisés au sein de cette espèce mais posent également de nouvelles questions et de nouvelles pistes de réflexion.

Il n'y a désormais plus de doute concernant l'influence de la gestion de la poulinière sur la modulation du potentiel génétique du poulain. Ainsi, les travaux présentés dans cette thèse confirment la relation entre la résistance à l'insuline maternelle, qui peut être induite par une alimentation non adaptée, et le développement de lésions ostéoarticulaires chez les poulains en croissance. Le rôle du placenta et en particulier de l'inflammation placentaire est à confirmer et à investiguer. Ces résultats appellent donc à réévaluer les recommandations nutritionnelles des poulinières sur le plan qualitatif. De plus, le retard de maturité à long terme des poulains primipares est un souci qu'il n'est à l'heure actuelle pas possible d'éviter.

Aujourd'hui, avec la diminution des surface disponibles et/ou de la qualité des sols, l'accès à des fourrages en qualité et/ou quantité suffisante n'est pas possible pour tous les éleveurs. Ainsi, des solutions doivent être développées pour pallier les effets délétères d'une alimentation non adaptée sur la jument et le poulain. L'utilisation de compléments alimentaires distribués en gestation est une possibilité à tester et valider. La poursuite actuelle de ce projet de thèse porte sur l'évaluation de l'effet de la supplémentation maternelle en arginine, un acide aminé dont la supplémentation alimentaire a des effets positifs sur le métabolisme glucidique de l'adulte et la croissance *in utero* chez d'autres espèces. D'autres supplémentations, par exemple en acides gras ω-3, qui ont une action anti-inflammatoire, sont aussi utilisées en élevage équin. L'évaluation des effets de leur utilisation pendant la gestation est aussi envisagée.

Il reste donc à la fois à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents des effets observés, à valider ces effets sur la performance des chevaux athlètes et enfin à développer des solutions pour diminuer au maximum les conséquences des influences de la vie précoce.

Avec Anne Ricard (unité INRA Biologie Intégrative et Génétique Équine), un financement auprès de l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) a déjà été obtenu. Ce projet a pour objectif d'utiliser la base de données SIRE (Système d'Information Relatif aux Equidés) afin d'analyser les performances des chevaux de concours de saut d'obstacles (CSO) en fonction de leur mode de

conception (insémination ou transfert d'embryon) et de la parité de leur mère génétique. Je vais donc mener à bien ce projet avant de rentrer dans la vie active en février 2018 avec un emploi dans une entreprise privée au sein de la filière de la nutrition équine.

Bibliographie

Bibliographie

Aagaard-Tillery KM, Grove K, Bishop J, Ke X, Fu Q, McKnight R et Lane RH (2008) Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: Maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *Journal of Molecular Endocrinology* **41** 91-102.

Abbott MJ, Roth TM, Ho L, Wang L, O'Carroll D et Nissenson RA (2015) Negative skeletal effects of locally produced adiponectin. *PLoS ONE* **10** e0134290.

Acker DA, Curran S, Bersu ET et Ginther OJ (2001) Morphologic stages of the equine embryo proper on days 17 to 40 after ovulation. *American Journal of Veterinary Research* **62** 1358-1364.

Adams AA, Katepalli MP, Kohler K, Reedy SE, Stilz JP, Vick MM, Fitzgerald BP, Lawrence LM et Horohov DW (2009) Effect of body condition, body weight and adiposity on inflammatory cytokine responses in old horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **127** 286-294.

Adamson GM et Billings RE (1992) Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **294** 223-229.

Adkin A, Warren L, Mortensen C et Kivipelto J (2013) Maternal supplementation of docosahexaenoic acid and its effect on fatty acid transfer to the foal. *Journal of Equine Veterinary Science* **33** 336.

Adkin AM, Muniz AV, Mortensen CJ et Warren LK (2015) Maternal fatty acid supplementation influences memory and learning ability in yearling and 2-year-old horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **35** 419.

Affonso F, Meirelles M, Alonso M, Guimaraes C, Lemes K, Nichi M et Fernandes C (2016) Influence of mare parity on weight, height, thoracic circumference and vitality of neonatal foals. *Journal of Equine Veterinary Science* **41** 67.

Ahima R, Dushay J, Flier S, Prabakaran D et Flier J (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *Journal of Clinical Investigation* **391-395** 391-395.

Ahren B et Havel P (1999) Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *American Journal of Physiology* **277** R959-66.

Aiken CE, Tarry-Adkins JL, Penfold NC, Dearden L et Ozanne SE (2016) Decreased ovarian reserve, dysregulation of mitochondrial biogenesis, and increased lipid peroxidation in female mouse offspring exposed to an obesogenic maternal diet. *FASEB Journal* **30** 1548-1556.

Aldridge L, Kelleher D, Reilly M et Brophy P (2000) Estimation of the genetic correlation between performances at different levels of show jumping competitions in Ireland Schätzung genetischer Korrelationen zwischen Springprüfungen unterschiedlicher Schwierigkeitsklassen in Irland. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **117** 65-72.

Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K *et al.* (2005) Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* **42** 1339-1348.

Alejandro B, Pérez R, Pedrana G, Milton JTB, Lopez A, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H et Martin GB (2002) Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, fertility, and development* **14** 333-337.

Allar A, Barrier-Battut I, Caillaud M, Chavatte-Palmer P, Deleuze S, Goudet G, Margat A et Marnay L (2013) *Gestion de la jument*. Institut français du cheval et de l'équitation.

Allen WR (1975) The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 405-413.

Allen WR (1982) Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horses and donkeys. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **31** 57-94.

Allen WR et Stewart F (2001) Equine placentation. *Reproduction, Fertility and Development* **13** 623.

Allen W et Wilsher S (2009) A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta* **30** 1005-1015.

Allen WR, Hamilton DW et Moor RM (1973) The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *The Anatomical Record* **177** 485-501.

Allen W, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale P et Fowden A (2002a) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* **123** 445-453.

Allen W, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale P et Fowden A (2002b) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* **172** 445-453.

Allen W, Wilsher S, Tiplady C et Butterfield R (2004) The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III postnatal growth. *Reproduction* **127** 67-77.

Allen W, Gower S et Wilsher S (2017) Localisation of epidermal growth factor (EGF), its specific receptor (EGF-R) and aromatase at the materno-fetal interface during placentation in the pregnant mare. *Placenta* **50** 53-59.

Allis CD et Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* **17** 487-500.

Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O 'brien CA, Bouillon R, Vanderschueren D, Stavros X et Manolagas C (2017) Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* **97** 135-187.

Altmäe S, Segura MT, Esteban FJ, Bartel S, Brandi P, Irmler M, Beckers J, Demmelmair H, López-Sabater C, Koletzko B *et al.* (2017) Maternal Pre-Pregnancy Obesity Is Associated with Altered Placental Transcriptome. *PLOS ONE* **12** e0169223.

de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R et Lorenzo M (2004) Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **279** 17070-17078.

Amoroso C (1952) Placentation. *Marshall's Physiology of reproduction* **2** 127-311.

Amstalden M, Garcia M, Stanko R, Nizielski S, Morrison C, Keisler D et Williams G (2002) Central Infusion of Recombinant Ovine Leptin Normalizes Plasma Insulin and Stimulates a Novel Hypersecretion of Luteinizing Hormone after Short-Term Fasting in Mature Beef Cows 1. *Biology of Reproduction* **66** 1555-1561.

Andersen KK, Frystyk J, Wolthers OD, Heuck C et Flyvbjerg A (2007) Gender Differences of Oligomers and Total Adiponectin during Puberty: A Cross-Sectional Study of 859 Danish School Children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92** 1857-1862.

Andreelli F, Foretz M, Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Pillot B, Bado A, Tronche F, Mithieux G *et al.* (2006) Liver Adenosine Monophosphate-Activated Kinase-α2 Catalytic Subunit Is a Key Target for the Control of Hepatic Glucose Production by Adiponectin and Leptin But Not Insulin. *Endocrinology* **147** 2432-2441.

Andrews F, Nadeau J, Saabye L et Saxton A (1997) Measurement of total body water content in horses, using deuterium oxide dilution. *American Journal of Veterinary Research* **58** 1060-1064.

Annandale E, Valberg S, Mickelson J et Seaquist E (2004) Insulin sensitivity and skeletal muscle glucose transport in horses with equine polysaccharide storage myopathy. *Neuromuscular Disorders* **14**

666-674.

Aoki T, Yamakawa K et Ishii M (2013) Factors affecting gestation length in heavy draft mares. *Journal of Equine Veterinary Science* **33** 437-440.

Arnaud G, Baudoin N, Trillaud-Geyl C, Dubroeucq H, Martin-Rosset W, Micol D, Lucbert J, Palazon R et Rivot D (1997a) *Notation de l'état corporel des cheaux de selle et de sport - Guide pratique*. Institut de l'Elevage.

Arnaud G, Perret G, Dubroeucq H et Rivot D (1997b) *Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport - Guide pratique*. Institut de l'élevage.

Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G et Sowers JR (2013) Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism: Clinical and Experimental* **62** 1543-1552.

Arthur G (1969) The fetal fluids of domestic animals. *Journal of Reproduction and Fertility* **9** 45-52.

Asayama K, Hayashibe H, Dobashi K, Uchida N, Nakane T, Kodera K, Shirahata A et Taniyama M (2003) Decrease in serum adiponectin level due to obesity and visceral fat accumulation in children. *Obesity research* **11** 1072-1079.

Ashworth C, Hoggard N, Thomas L, Mercer J, Wallace J et Lea R (2000) Placental leptin. *Reviews of Reproduction* **5** 18-24.

Asplin K, Curlewis J, Mcgowan C, Pollitt C et Sillence M (2011) Glucose transport in the equine hoof. *Equine Veterinary Journal* **43** 196-201.

Astudillo P, Ríos S, Pastenes L, Pino AM et Rodríguez JP (2008) Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) is characterized by impaired leptin action. *Journal of Cellular Biochemistry* **103** 1054-1065.

Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S, Evdokiou A, Harrison K, Findlay DM et Zannettino ACW (2003) RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **18** 1088-1098.

Austbø D (2004) The Scandinavian adaptation of the French UFC system. In *Nutrition of the performance horse*, p 69-78. Éd V Julliand et W Martin-Rosset. Wageningen Academic Publishers.

Aye ILMH, Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Dudley DJ, Jansson T et Powell TL (2014) Increasing

maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. *Biology of reproduction* **90** 129.

Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA et Tracy RP (2004) Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: A randomized crossover study. *American Journal of Clinical Nutrition* **79** 969-973.

Baggio L et Drucker D (2007) Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132** 2131-2157.

Baird J (1986) Some aspects of the metabolic and hormonal adaptation to pregnancy. *Acta Endocrinologica* **113** S11-S18.

Balakrishnan B, Dai H, Janisse J, Romero R et Kannan S (2013) Maternal endotoxin exposure results in abnormal neuronal architecture in the newborn rabbit. *Developmental Neuroscience* **35** 396-405.

Baldock PA, Lee NJ, Driessler F, Lin S, Allison S, Stehrer B, Lin EJD, Zhang L, Enriquez RF, Wong IPL *et al.* (2009) Neuropeptide Y knockout mice reveal a central role of NPY in the coordination of bone mass to body weight. *PLoS ONE* **4**.

Bale TL (2015) Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature reviews. Neuroscience* **16** 332-344.

Bamford NJ, Potter SJ, Harris PA et Bailey SR (2015) Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in horses and ponies fed a high fat diet, with or without a once daily high glycaemic meal. *Equine Veterinary Journal* **48** 368-373.

Bamford N, Potter S, Baskerville C, Harris P et Bailey S (2016) Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in different equine breeds adapted to cereal-rich or fat-rich meals. *Veterinary Journal* **214** 14-20.

Banach M et Evans J (1981) Effects of inadequate energy during gestation and lactation on the estrous cycle and conception rates of mares and on their foal weights. In *Proceedings of the Equine Nutrition Physiology and Society Symposium, 7th edition*, p 97-100. Warrenton: Equine Nutrition and Physiology Society.

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB et Maness LM (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* **17** 305-311.

Barb CR, Yan X, Azain MJ, Kraeling RR, Rampacek GB et Ramsay TG (1998) Recombinant porcine leptin

reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine. *Domestic Animal Endocrinology* **15** 77-86.

Barber T, Viña JR, Viña J et Cabo J (1985) Decreased urea synthesis in cafeteria-diet-induced obesity in the rat. *Biochemical Journal* **230** 675-681.

Barker D, Osmond C, Winter P, Margetts B et Simmonds S (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *The Lancet* **334** 577-580.

Barone R et Monnet C (1955) Les mamelles des équidés domestiques. *Bulletin de la Société de Sciences Vétérinaires de Lyon* **57** 73-92.

Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI et Cushman SW (1997) Insulin Stimulates Both Leptin Secretion and Production by Rat White Adipose Tissue. *Endocrinology* **138** 4463-4472.

Barreto R da SN, Rodrigues MN, Carvalho RC, Fernanda FM, Rigoglio NN, Jacob JCF, Gastal EL et Miglino MA (2016) Organogenesis of the Musculoskeletal System in Horse Embryos and Early Fetuses. *Anatomical Record* **299** 722-729.

Barrey E, Mucher E, Jeansoule N, Larcher T, Guigand L, Herszberg B, Chaffaux S, Guérin G, Mata X, Benech P *et al.* (2009) Gene expression profiling in equine polysaccharide storage myopathy revealed inflammation, glycogenesis inhibition, hypoxia and mitochondrial dysfunctions. *BMC Veterinary Research* **5** 29.

Barrey E, Jayr L, Mucher E, Gospodnetic S, Joly F, Benech P, Alibert O, Gidrol X, Mata X, Vaiman A *et al.* (2011) Transcriptome analysis of muscle in horses suffering from recurrent exertional rhabdomyolysis revealed energetic pathway alterations and disruption in the cytosolic calcium regulation. *Animal Genetics* **43** 271-281.

Barron J (1995) The effect of maternal age and parity on the racing performance of Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal* **27** 73-75.

Bastos L, Dubiella A, Bastos F, Barussi F, Webber S, Costa M et Michelotto P (2017) Incidence of Juvenile Osteochondral conditions in thoroughbred weanlings in the south of Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*.

Battin EE et Brumaghim JL (2009) Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics* **55** 1-23.

Battista JM, Tallmadge RL, Stokol T et Felippe MJB (2014) Hematopoiesis in the equine fetal liver suggests immune preparedness. *Immunogenetics* **66** 635-649.

Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D et Bruyas JF (1997) Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine veterinary journal. Supplement* **25** 60-62.

Bautista CJ, Rodriguez-Gonzàlez GL, Morales A, Lomas-Soria C, Cruz-Perez F, Reyes-Castro LA et Zambrano E (2017) Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system. *Reproduction, Fertility and Development* **In Press**.

Bazzano M, Giannetto C, Fazio F, Arfuso F, Giudice E et Piccione G (2014) Metabolic Profile of Broodmares During Late Pregnancy and Early Post-Partum. *Reproduction in Domestic Animals* **49** 947-953.

Bell A, Slepetis R et Ehrhardt U (1995) Growth and accretion of energy and protein in the gravid uterus during late pregnancy in holstein cows. *Journal of Dairy Science* **78** 1954-1961.

Bell R, Nielsen B, Waite K, Rosenstein D et Orth M (2001) Daily access to pasture turnout prevents loss of mineral in the third metacarpus of Arabian weanlings. *Journal of Animal Science* **79** 1142-1150.

Benaitreau D, Dieudonné M-N, Dos Santos E, Leneveu M-C, Mazancourt P De et Pecquery R (2009) Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biology of reproduction* **80** 1107-1114.

Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu MC, Alfaidy N, Feige JJ, De Mazancourt P, Pecquery R et Dieudonné MN (2010) Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *Journal of Endocrinology* **207** 45-53.

Benovic J, Bouvier M, Caron M, Lefkowitz R et Carolina N (1988) Cyclase-coupled β-adrenergic receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **4** 405-428.

Bergin WC, Gier HT, Marion GB et Coffman JR (1970) A Developmental Concept of Equine Cryptorchism. *Biology of Reproduction* **3** 82–92.

Berglund ED, Vianna CR, Donato J, Kim MH, Chuang J-C, Lee CE, Lauzon DA, Lin P, Brule LJ, Scott MM *et al.* (2012) Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *The Journal of clinical investigation* **122** 1000-1009.

Bergman R (1989) Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes* **38** 1512-1527.

Bergman R (2005) Minimal model: perspective from 2005. *Horm Res* **64 Suppl 3** 8-15.

Bergman R, Phillips L et Cobelli C (1981) Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man. Measurement of insulin sensitivity and β-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. *Journal of Clinical Investigation* **68** 1456-1467.

Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U et Reseland JE (2004) Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* **35** 842-849.

Bernstein AM, Roizen MF et Martinez L (2014) Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: A double-blinded, randomized, placebo controlled study. *Journal of Clinical Lipidology* **8** 612-617.

Betteridge KJ (1989) Oocyte Fertilisation and Embryo Micromanipulation The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Veterinary Journal* **8** 92-100.

Beythien E, Aurich C, Wulf M et Aurich J (2017) Effects of season on placental, foetal and neonatal development in horses. *Theriogenology*.

van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P et Löwik CWGM (2004) Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine* **199** 805-814.

Biensen NJ, Wilson ME et Ford SP (1999) The impacts of uterine environment and fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in pigs. *Journal of Animal Science* **77** 954-959.

Bilbo S et Tsang V (2010) Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *The FASEB journal* **24** 2104-2115.

Bispham J, Gopalakrishnan GS, Dandrea J, Wilson V, Budge H, Keisler DH, Pipkin FB, Stephenson T et Symonds ME (2003) Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: Consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology* **144** 3575-3585.

Björnsdóttir S, Axelsson M, Eksell P, Sigurdsson H et Carlsten J (2000) Radiographic and clinical survey of degenerative joint disease in the distal tarsal joints in Icelandic horses. *Equine Veterinary Journal* **32** 268-272.

Blümer R, van Roomen C, Meijer A, Houben-Weerts J, Sauerwein H et Dubbelhuis P (2008) Regulation of adiponectin secretion by insulin and amino acids in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism* **57** 1655-1662.

Boado A et Lopez-Sanroman F (2016) Prevalence and characteristics of osteochondrosis in 309 Spanish Purebred horses. *The Veterinary Journal* **207** 112-117.

Böhme K, Conscience-Egli M, Tschan T, Winterhalter KH et Bruckner P (1992) Induction of proliferation or hypertrophy of chrondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *The Journal of Cell Biology* **116** 1035-1042.

Bondo T et Jensen SK (2011) Administration of RRR-a-tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and enhances vitamin E and IgM status in foals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **95** 214-222.

Bonelli F, Rota A, Corazza M, Serio D et Sgorbini M (2016) Hematological and biochemical findings in pregnant, postfoaling, and lactating jennies. *Theriogenology* **85** 1233-1238.

Borst SE (2004) The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine* **23** 177-182.

Bossaert P, Leroy J, Vliergher S et Opsomer G (2008) Interrelations between Glucose-induced Insulin Response, Metabolic Indicators and Time of First Ovulation in High-yielding Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **91** 3363-3371.

Boston RC, Stefanovski D, Moate PJ, Sumner AE, Watanabe RM et Bergman RN (2003) MINMOD Millennium: a computer program to calculate glucose effectiveness and insulin sensitivity from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *Diabetes technology & therapeutics* **5** 1003-1015.

Böttner A, Kratzsch J, Müller G, Kapellen TM, Blüher S, Keller E, Blüher M et Kiess W (2004) Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89** 4053-4061.

Boura-Halfon S et Zick Y (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **296** E581--91.

Bouwman H et Schee W van der (1978) Composition and production of milk from Dutch warmblooded saddle horse mares. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **40** 39-53.

Bradley RL et Cheatham B (1999) Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* **48**.

Bridges CH, Womack JE, Harris ED et Scrutchfield WL (1984) Considerations of copper metabolism in osteochondrosis of suckling foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **185** 173-178.

Bruning J, Gautam D, Burks D, Gillette J, Schubert M et Orban P (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289** 2122-2125.

Bucholtz DC, Chiesa A, Pappano WN, Nagatani S, Tsukamura H, Maeda KI et Foster DL (2000) Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biology of reproduction* **62** 1248-1255.

Buff P, Dodds A, Morrison C, Whitley N, McFadin E, Daniel J, Djiane J et Keisler D (2002) Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *Journal of Animal Science* **80** 2942-2948.

Buist SE, Kouba JM, Lillich JD, Blevins CA, Grieger DG, Stevenson J et Webel S (2015) Peripartum maternal DHA/EPA supplementation and the effect on mare reproductive parameters and foal bone metabolism. *Journal of Equine Veterinary Science* **35** 441.

van der Burg JW, Sen S, Chomitz VR, Seidell JC, Leviton A et Dammann O (2015) The role of systemic inflammation linking maternal body mass index to neurodevelopment in children. *Pediatric Research* **79** 3-12.

Burk A et Williams C (2008) Feeding management practices and supplement use in top-level event horses. *Comparative Exercise Physiology* **5** 85-93.

Burns TA, Geor RJ, Mudge MC, Mccutcheon LJ, Hinchcliff KW et Belknap JK (2010) Proinflammatory C ytokine and Che mokine Ge ne Expr ess ion Pr ofiles in Subcutaneous and Vi scer al Adipos e T iss ue Depots o f I n s u l i n - R e s i s t a n t a n d In s u l i n - S e n s i t i v e L i g h t Br e e d H o r s e s. 932-939.

Butler AA et LeRoith D (2001) Minireview: Tissue-Specific *Versus* Generalized Gene Targeting of the *igf1* and *igf1r* Genes and Their Roles in Insulin-Like Growth Factor Physiology. *Endocrinology* **142** 1685-1688.

Byers P et Brown R (2006) Cell columns in articular cartilage physes questioned: A review. *Osteoarthritis and Cartilage* **14** 3-12.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J et Shoelson SE (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-β and NF-κB. *Nature Medicine* **11** 183-190.

Cai Y, Yu X, Hu S et Yu J (2009) A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* **7** 147-154.

Cammisotto P et Bendayan M (2012) A review on gastric leptin: the exocrine secretion of a gastric hormone. *Anatomy & Cell Biology* **45** 1.

Carbery JT (1978) Osteodysgenesis in a foal associated with copper deficiency. *New Zealand Veterinary Journal* **26** 279-279.

Carlson C, Cullins L et Meuten D (1995) Osteochondrosis of the articular-Carlson C, Cullins L et Meuten D (1995) Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. Veterinary Pathology 32 641-647.epiphyseal carti. *Veterinary Pathology* **32** 641-647.

Carlsten J, Sandgrent B et Dalin G (1993a) Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters . I . A radiological survey. *Equine Veterinary Journal* **16** 42-47.

Carlsten J, Sandgrent B, Dalin G, Sandgren B, Dalin G, Carlsten J, Lundehelmt N et Carlstenf J (1993b) Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters . I . A radiological survey. *Equine Veterinary Journal* **16** 42-47.

Carro E, Señaris R, Considine R V., Casanueva FF et Dieguez C (1997) Regulation of *in Vivo* Growth Hormone Secretion by Leptin. *Endocrinology* **138** 2203-2203.

Carrol C et Huntington P (1988) Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Veterinary Journal* **20** 41-45.

Carter R, Geor R, Burton Staniar W, Cubitt T, Harris P, S B, Cubitt T et Harris P (2009a) Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Veterinary Journal* **179** 204-210.

Carter R, McCutcheon L, George L, Smith T, Frank N et Geor R (2009b) Effects of diet-induced weight gain on insulin sensitivity and plasma hormone and lipid concentrations in horses. *American Journal of Veterinary Research* **70** 1250-1258.

Cartmill J, Thompson D, Storer W, Gentry L et Huff N (2003) Endocrine responses in mares and geldings with high body condition scores grouped by high vs. low resting leptin concentrations. *American Society of Animal Science.* **81** 2311-2321.

Casas M, Chatzi L, Carsin AE, Amiano P, Guxens M, Kogevinas M, Koutra K, Lertxundi N, Murcia M, Rebagliato M *et al.* (2013) Maternal pre-pregnancy overweight and obesity, and child neuropsychological development: Two southern european birth cohort studies. *International Journal of Epidemiology* **42** 506-517.

Cash R (1995) Colostral quality determination by simple refractometry. A preliminary investigation. In *Centaur XI*, p 56-59.

Cauley JA (2015) Estrogen and bone health in men and women. *Steroids* **99** 11-15.

Caure S et Lebreton P (2004) Ostéochondrose chez le trotteur au sevrage et corrélation avec divers paramètres. *Pratique Vétérinaire Equine* **36** 47-57.

Cavinder C, Burns S, Coverdale J, Hammer C, Holub G et Hinrichs K (2012) Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. *The Professional Animal Scientist* **28** 344-350.

Cawthorn WP et Sethi JK (2008) TNF-α and adipocyte biology. *FEBS Letters* **582** 117-131.

Cebulj-Kadunc N, Kosec M et Cestnik V (2009) Serum Leptin Concentrations in Lipizzan Fillies. *Reproduction in Domestic Animals* **44** 1-5.

Chadio S et Kotsampasi B (2017) The role of early life nutrition in programming of reproductive function. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* **5** 2-15.

Challier J, Basu S, Bintein T, Hotmire K, Minium J, Catalano P et Hauguel-de Mouzon S (2008) Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* **29** 274-281.

Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, Che L, Palin M-F, Murphy BD et Bordignon V (2008) Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domestic Animal Endocrinology* **35** 198-207.

Chavatte P, Rossdale P et Tait A (1995) Modulation of 3b-hydroxysteroid dehydrogenase (3bHSD)

activity in the equine placenta by pregnenolone and progesterone metabolites. *Equine Veterinary Journal* **27** 342-347.

Chavatte P, Holtan D, Ousey JC et Rossdale PD (1997) Biosynthesis and possible biological roles of progestagens during equine pregnancy and in the newborn foal. *Equine Veterinary Journal* **24** 89-95.

Chavatte P, Clément F, Cash R et Grongnet JF (1998) Field determination of colostrum quality by using a novel, practical method. *Proc Annual Convention AAEP* **44** 206-209.

Chavatte-Palmer P et Tarrade A (2016) Placentation in different mammalian species. *Annales d'Endocrinologie*.

Chavatte-Palmer P, Dupont C, Debus N et Camous S (2014) Nutritional programming and the reproductive function of the offspring. *Animal Production Science*.

Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Kiefer H, Duranthon V et Jammes H (2016) Breeding animals for quality products: not only genetics. *Reproduction, Fertility and Development* **28** 94-111.

Chen X et Yang T (2015) Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **33** 474-485.

Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I et Quon M (2003) Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **278** 45021-45026.

Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse E, Vatish M et Randeva H (2006) Secretion of adiponectin by human placenta: Differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* **49** 1292-1302.

Chen X, Wu Y, Liu L, Tian H et Yu X (2014) Osteocalcin is inversely associated with glucose levels in middle-aged Tibetan men with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **30** 476-482.

Cheong Y, Sadek KH, Bruce KD, MacKlon N et Cagampang FR (2014) Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring. *Fertility and Sterility* **102** 899-907.

Cherrington A, Sindelar D, Edgerton D, Steiner K et McGuinness O (2002) Physiological consequences of phasic insulin release in the normal animal. *Diabetes* **51** 103-108.

Chevrel G, Granet C et Miossec P (2005) Contribution of tumour necrosis factor alpha and interleukin (IL) 1beta to IL6 production, NF-kappaB nuclear translocation, and class I MHC expression in muscle cells: in vitro regulation with specific cytokine inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases* **64** 1257-1262.

Chiang S, Baumann C, Kanzaki M, Thurmond D, Watson R, Neudauer C, Macara I, Pessin J et Saltiel A (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410** 944-948.

Christie J, Hewson C, Riley C, McNiven M, Dohoo I et Bate L (2006) Management factors affecting stereotypies and body condition score in nonracing horses in Prince Edward Island. *The Canadian veterinary journal* **47** 136-143.

Čikoš Š, Burkuš J, Bukovská A, Fabian D, Rehák P et Koppel J (2010) Expression of adiponectin receptors and effects of adiponectin isoforms in mouse preimplantation embryos. *Human Reproduction* **25** 2247-2255.

Cirmanová V, Bayer M, Stárka L et Zajíčková K (2008) The effect of leptin on bone - An evolving concept of action. *Physiological Research* **57**.

Clark E, Ness A et Tobias J (2006) Adipose tissue stimulates bone growth in prepubertal children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91** 2534-2541.

Clegg MT, Boda JM et Cole HH (1954) The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin. *Endocrinology* **54** 448-463.

Clemmons AJ, Thompson DL et Johnson L (1995) Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biology of reproduction* **52** 1258-1267.

Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD et Kahn SE (2003) Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* **46** 459-469.

Coenen M, Kienzle E, Vervuert I et Zeyner A (2011) Recent German Developments in the Formulation of Energy and Nutrient Requirements in Horses and the Resulting Feeding Recommendations. *Journal of Equine Veterinary Science* **31** 219-229.

Cole HH et Hart GH (1933) The development and hormonal content of fetal horse gonads. *The Anatomical Record* **56** 275-293.

Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L *et al.* (2004) A Transgenic Mouse with a Deletion in the Collagenous Domain of Adiponectin Displays Elevated Circulating Adiponectin and Improved Insulin Sensitivity. *Endocrinology* **145** 367-383.

Conley AJ (2016) Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. *Theriogenology* **86** 355-365.

Conn VS, Koopman RJ, Ruppar TM, Phillips LJ, Mehr DR et Hafdahl AR (2014) Insulin Sensitivity Following Exercise Interventions: Systematic Review and Meta-Analysis of Outcomes Among Healthy Adults. *Journal of primary care & community health* **5** 211-222.

Connelly MA, Gruppen EG, Otvos JD et Dullaart RPF (2016) Inflammatory glycoproteins in cardiometabolic disorders, autoimmune diseases and cancer. *Clinica Chimica Acta* **459** 177-186.

Consiglio A, Elena M, Aquila D, Fiandanese N, Ambruosi B, Cho YS, Bosi G, Arrighi S, Lacalandra G et Cremonesi F (2009) Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7** 113.

Contu L et Hawkes CA (2017) A review of the impact of maternal obesity on the cognitive function and mental health of the offspring. *International Journal of Molecular Sciences* **18** 1093.

Coppack SW (2001) Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society* **60** 349-356.

Cornish J, Callon K, Bava U, Lin C, Naot D, Hill B, Grey A, Broom N, Myers D, Nicholson G *et al.* (2002) Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *Journal of Endocrinology* **175** 405-415.

Coskun A, Ozdemir O, Erol M et Kirbiyik H (2016) The relationship of copper concentrations in feed and plasma to developmental orthopedic disease in foals. *Veterinarski Arhiv* **86** 287-294.

Coverdale J, Hammer C et Walter K (2015) Nutritional programming and the impact on mare and foal performance. *Journal of animal science* **93** 3261-3267.

Cross D, Alessi D, Cohen P, Andjelkovich M et Hemmings B (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378** 785-789.

Crowell-Davis SL, Houpt KA et Carnevale J (1985) Feeding and drinking behavior of mares and foals

with free access to pasture and water. *Journal of animal science* **60** 883-889.

CVB (2016) *Veevoedertabel 2016*.

Cymbaluk N et Laarveld B (1996) The ontogeny of serum insulin-like growth factor-I concentration in foals: effects of dam parity, diet, and age at weaning. *Domestic animal endocrinology* **13** 197-209.

Dahlman I, Forsgren M, Sjögren A, Nordström EA, Kaaman M, Näslund E, Attersand A et Arner P (2006) Downregulation of Electron Transport Chain Genes in Visceral Adipose Tissue in Type 2 Diabetes Independent of Obesity and Possibly Involving Tumor Necrosis Factor-α. *Diabetes* **55**.

Daley CA, Abbott A, Doyle PS, Nader GA et Larson S (2010) A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition journal* **9** 10.

Dall'Aglio C, Polisca A, Boiti C et Ceccarelli P (2012) Immunolocalization of leptin and its receptor in the placenta of cats. *Acta Histochemica* **114** 714-719.

Dall'Aglio C, Mercati F, Pascucci L et Ceccarelli P (2013) Immunolocalization of leptin and its receptor in the pancreas of the horse. *Acta Histochemica* **115** 757-760.

Dallas SL, Prideaux M et Bonewald LF (2013) The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. *Endocrine Reviews* **34** 658-690.

van Dam K, van Breda E, Schaart G, van Ginneken M, Wijnberg I, de Graaf-Roelfsema E, van der Kolk J et Keizer H (2004) Investigation of the expression and localization of glucose transporter 4 and fatty acid translocase/CD36 in equine skeletal muscle. *American journal of veterinary research* **65** 951-956.

Dammann O et Gressens P (2012) Integrated mechanism reviews. *Pediatric research* **71** 530-531.

Daughaday WH, Haal K, Raben MS, Jun WDS, Brande L VAN DEN et Wyk JJ VAN (1972) Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* **235(5333)** 107.

Davicco MJ, Faulconnier Y, Coxam V, Dubroeucq H, Martin-Rosset W et Barlet JP (1994) Systemic bone growth factors in light breed mares and their foals. *Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique* **102** 115-119.

Dawson M et Hone J (2012) Demography and dynamics of three wild horse populations in the australian alps. *Austral Ecology* **37** 97-109.

Deardorff J, Smith LH, Petito L, Kim H et Abrams BF (2017) Maternal Prepregnancy Weight and

Children's Behavioral and Emotional Outcomes. *American Journal of Preventive Medicine* **In press**.

Denoix J-M (1990) Sémiologie radiographique générale des articulations. *Prat Vet Equine* **22** 14-17.

Denoix J-M, Jeffcott L, McIlwraith C et van Weeren P (2013) A review of terminology for equine juvenile osteochondral conditions (JOCC) based on anatomical and functional considerations. *The Veterinary Journal* **197** 29-35.

Desai M, Jellyman JK, Han G, Lane RH et Ross MG (2015) Programmed regulation of rat offspring adipogenic transcription factor (PPARγ) by maternal nutrition. *J Dev Orig Health Dis* **6** 530-538.

Desforges M et Sibley CP (2010) Placental nutrient supply and fetal growth. *International Journal of Developmental Biology* **54** 377-390.

Dik K et Enzerink E (1999) Radiographic development of osteochondral abnormalities , in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals , from age 1 to 11 months. *Equine Veterinary Journal* **31** 9-15.

Dimitri P, Jacques R, Paggiosi M, King D, Walsh J, Taylor Z, Frangi A, Bishop N et Eastell R (2015) Leptin may play a role in bone microstructural alterations in obese children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **100** 594-602.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R et Zeiher M (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399** 601-605.

Dinarello C a (2007) Historical Review of Cytokines. *European Journal of Immunology* **37** S34-S45.

Dolvik N et Klemetsdal G (1999) Conformational traits of Norwegian cold-blooded trotters: Heritability and the relationship with performance. *Acta Agriculturae Scandinavica - Section A: Animal Science* **49** 156-162.

Donabédian M, Fleurance G, Perona G, Robert C, Lepage O, Trillaud-Geyl C, Leger S, Ricard A, Bergero D, Martin-Rosset W *et al.* (2006) Effect of fast vs. moderate growth rate related to nutrient intake on developmental orthopaedic disease in the horse. *Animal Research* **55** 471-486.

Donabédian M, van Weeren P, Perona G, Fleurance G, Robert C, Léger S, Bergero D, Lepage O et Martin-Rosset W (2008) Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse. *Equine veterinary journal* **40** 253-259.

Dong Q, Lazarus R, Wong L, Vellios M et Handelsman D (1991) Pulsatile LH secretion in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Journal of Endocrinology* **131** 49-55.

Doreau M, Martin-Rosset W et Boulot S (1988) Energy requirements and the feeding of mares during lactation: A review. *Livestock Production Science* **20** 53-68.

Doreau M, Boulot S et Martin-Rosset W (1991) Effect of parity and physiological state on intake, milk production and blood parameters in lactating mares differing in body size. *Animal Production* **53** 111-118.

Dörner G (1975) *Anatomical neuroendocrinology. Perinatal hormone levels and brain organization*. S. Karger AG.

Douglas J (2011) Pathogenesis of osteochondrosis. In *Diagnosis and management of lameness in the horse*, Second edi, p 617-625. Éd M Ross et S Dyson. Saint-Louis: Saunders, Elsevier.

Douglas R et Ginther O (1975) Development of the equine fetus and placenta. *Journal of Reproduction and Fertility* **23** 503-505.

Doyle M et Egan J (2007) Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacology & Therapeutics* **113** 546-593.

Du J, Zhang M, Lu J, Zhang X, Xiong Q, Xu Y, Bao Y et Jia W (2016) Osteocalcin improves nonalcoholic fatty liver disease in mice through activation of Nrf2 and inhibition of JNK. *Endocrine* **53** 701-709.

Dube E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, Forest J-C, Giguere Y, Masse A et Lafond J (2012) Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. *Biology of Reproduction* **87** 14-14.

Dubé E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, Forest J-C, Giguère Y, Masse A et Lafond J (2012) Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. *Biology of Reproduction* **87** 1-11.

Dubova EA, Pavlov KA, Borovkova EI, Bayramova MA, Makarov IO et Shchegolev AI (2011) Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in the Placenta of Pregnant Women with Obesity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **151** 253-258.

Ducy P (2011) The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* **54** 1291-1297.

Ducy P, Schinke T et Karsenty G (2000) The Osteoblast : A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science* **289** 1501-1504.

Dugdale A, Curtis G, Cripps P, Harris P et Mc Gregor Argo C (2010) Effect of dietary restriction on body

condition, composition and welfare of overweight and obese pony mares. *Equine Veterinary Journal* **42** 600-610.

Dugdale A, Curtis G, Harris P et Argo C (2011) Assessment of body fat in the pony: Part I. Relationships between the anatomical distribution of adipose tissue, body composition and body condition. *Equine Veterinary Journal* **43** 552-561.

Dühlmeier R, Deegen E, Fuhrmann H, Widdel A et Sallmann H (2001) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and the enteroinsular axis in equines (Equus caballus). *Comparative Biochemistry and Physiology* **129** 563-575.

Dunbar BL et Bauer JE (2002) Metabolism of dietary essential fatty acids and their conversion to long-chain polyunsaturated metabolites. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **220** 1621-1626.

Duncan Bassett JH et Williams GR (2016) Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. *Endocrine Reviews* **37** 135-187.

Dusek J (1966) Notes sur le développement prénatal des chevaux (en Tchèque). *Vedecke Prace Výzkumné Stanice pro Chov Koni Slatińany* **2** 1-25.

Dyall SC (2015) Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience* **7** 52.

Eades SC, Stokes AM, Johnson PJ, Leblanc CJ, Ganjam VK, Buff PR et Moore RM (2007) Serial alterations in digital hemodynamics and endothelin-1 immunoreactivity, platelet-neutrophil aggregation, and concentrations of nitric oxide, insulin, and glucose in blood obtained from horses following carbohydrate overload. *American Journal of Veterinary Research* **68** 87-94.

Ealey KN, Fonseca D, Archer MC et Ward WE (2006) Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice. *Regulatory Peptides* **136** 9-13.

Ehrhardt R., Slepetis R., Bell A. et Boisclair Y. (2001) Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* **21** 85-96.

Ehrström M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner A, Grybäck P, Jacobsson H, Hellström PM et Näslund E (2005) Inhibitory Effect of Exogenous Orexin A on Gastric Emptying, Plasma Leptin, and the Distribution of Orexin and Orexin Receptors in the Gut and Pancreas in Man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90** 2370-2377.

Eivers S, McGivney B, Fonseca R, MacHugh D, Menson K, Park S, Rivero J-L, Taylor C, Katz L et Hill E (2010) Alterations in oxidative gene expression in equine skeletal muscle following exercise and training. *Journal of applied physiology* **40** 83-93.

El-Maaty A et Gabr F (2010) Relation between leptin and estradiol levels in Egyptian lactating Arab mares during foaling heat. *Animal Reproduction Science* **117** 95-98.

El-Maaty A, Sisy G, Shaker M et Ezzo O (2014) Age-related rump fat, fat percent, body fat mass, leptin, androgens and semen parameters of Arab stallions. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **3** 184-191.

Elbers J, Asscheman H, Seidell J, Frölich M, Meinders A et Gooren L (1997) Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 3267-3270.

Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M *et al.* (2005) Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* **434** 514-520.

Eley R, Thatcher W, Bazer F, Wilcox C, Becker R, Head H et Adkinson R (1978) Development of the Conceptus in the Bovine. *Journal of Dairy Science* **61** 467-473.

Elliott C, Morton J et Chopin J (2009) Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology* **71** 683-689.

Elmquist J (2001) Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiology and Behavior* **74** 703-708.

Ely E, Price J, Smith R, Wood J et Verheyen K (2010) The effect of exercise regimens on racing performance in National Hunt racehorses. *Equine Veterinary Journal* **42** 624-629.

Enders AC et Liu IK (1991a) Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **44** 427-438.

Enders AC et Liu IKM (1991b) Trophoblast-Uterine interactions during equine chorionic girdle cell maturation, migration, and transformation. *American Journal of Anatomy* **192** 366-381.

Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, Möhlig M, Pfeiffer AFH, Luft FC et Sharma AM (2003) Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* **52** 942-947.

Engelke JA, Hale JE, Suttie JW et Price PA (1991) Vitamin K-dependent carboxylase: utilization of decarboxylated bone Gla protein and matrix Gla protein as substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* **1078** 31-34.

Den Engelsen (1966) Het gewicht van de landbouwhuisdieren. *Veteelt Ziuvelber* **9** 293-310.

Enquobahrie DA, Williams MA, Qiu C, Meller M et Sorensen TK (2009) Global placental gene expression in gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **200** 206.e1-206.e13.

Escofier B et Pagès J (1994) Multiple factor analysis (AFMULT package). *Computational Statistics and Data Analysis* **18** 121-140.

Ewart JC (1915) Studies on the Development of the Horse: The Development During the Third Week. I. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* **51** 287-329.

Fang L, Zhang M, Li Y, Liu Y, Cui Q et Wang N (2016) PPARgene: A Database of Experimentally Verified and Computationally Predicted PPAR Target Genes. *PPAR Research* **2016** 1-6.

Fantuzzi G (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115** 911-920.

Fantuzzi G (2008) Adiponectin and inflammation: Consensus and controversy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121** 326-330.

Farley DM, Choi J, Dudley DJ, Li C, Jenkins SL, Myatt L et Nathanielsz PW (2010) Placental Amino Acid Transport and Placental Leptin Resistance in Pregnancies Complicated by Maternal Obesity q. *Placenta* **31** 718-724.

Farmer SR (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism* **4** 263-273.

Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J et Paschke R (2003) Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **301** 1045-1050.

Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lössner U, Blüher M et Paschke R (2004) Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* **558** 27-32.

Fédération Equestre Internationale (2015) *Internal regulations of the FEI*.

Fédération Française d'Equitation (2017) *Règlement des compétitions*.

Fehmann H, Peiser C, Bode H, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang R et Göke B (1997) Leptin: A potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* **18** 1267-1273.

Fei H, Okano H, Li C, Lee G, Zhao C, Darnell R et Friedman J (1997) Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** 7001-7005.

Fernandes C, Meirelles M, Guimaraes C, Nichi M, Affonso F, Fonte J, Onoe E et Alonso M (2014) Which paternal, maternal and placental parameters influence foal size and vitality? *Journal of Equine Veterinary Science* **34** 225-227.

Fernandes K, Rogers C, Gee E, Bolwell C et Thomas D (2015) Body condition and morphometric measures of adiposity in a cohort of Pony Club horses and ponies in New Zealand. In *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, p 195-199. Dudenin.

Fernandez-Vojvodich P, Zaman F et Sävendahl L (2013) Interleukin-6 acts locally on the growth plate to impair bone growth. *Annals of the rheumatic diseases* **72** e24.

Ferreira-dias G, Claudino F, Carvalho H, Agricola R, Alpoim-Moreira J, Robalo Silva J et Agr R (2005) Seasonal reproduction in the mare : Possible role of plasma leptin, body weight and immune status. *Domestic Animal Endocrinology* **29** 203-213.

Ferrell C (1991) Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow.2. Blood flow and nutrient flux. *Journal of Animal Science* **69** 1954-1965.

Ferron M, Hinoi E, Karsenty G et Ducy P (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** 5266-5270.

Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho R, Teti A, Ducy P et Karsenty G (2010a) Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell* **142** 296-308.

Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P et Karsenty G (2010b) Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell* **142** 296-308.

Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P et Karsenty G (2012) Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone* **50** 568-575.

Field ME, Anthony R V., Engle TE, Archibeque SL, Keisler DH et Han H (2015) Duration of maternal undernutrition differentially alters fetal growth and hormone concentrations. *Domestic Animal*

Endocrinology **51** 1-7.

Finck BN et Johnson RW (2000) Tumor necrosis factor (TNF)-α induces leptin production through the p55 TNF receptor. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **278**.

Finocchio E (1985) Race performance and its relationship to birthrank and maternal age. I. In *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*.

Finocchio E, Lema J et Finocchio E (1985) Race performance and its relationship to birthrank and maternal age. I. In *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*.

Ford SP, Hess BW, Schwope MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H et Nathanielsz PW (2007) Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *Journal of Animal Science* **85** 1285-1294.

Forhead AJ et Fowden AL (2009) The hungry fetus ? Role of leptin as a nutritional signal before birth. *Journal of Ph* **587** 1145-1152.

Forhead A, Ousey J, Allen W et Fowden A (2004) Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *Journal of Endocrinology* **181** 459-467.

Forro M, Cieslar S, Ecker G, Walzak A, Hahn J et Lindinger M (2000) Total body water and ECFV measured using bioelectrical impedance analysis and indicator dilution in horses. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **89** 663-671.

Fowden A, Barnes R, Comline R et Silver M (1980) Pancreatic beta-cell function in the fetal foal and mare. *The Journal of endocrinology* **87** 293-301.

Fowden A, Comline R et Silver M (1984a) Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. *Equine Veterinary Journal* **16** 239-246.

Fowden A, Silver M, Ellis L, Ousey J et Rossdale P (1984b) Studies on equine prematurity 3: Insulin secretion in the foal during the perinatal period. *Equine Veterinary Journal* **16** 286-291.

Fowden AL, Forhead AJ, White KL et Taylor PM (2000a) Equine Uteroplacental Metabolism at Mid- and Late Gestation. *Experimental Physiology* **85** 539-545.

Fowden a L, Taylor PM, White KL et Forhead a J (2000b) Ontogenic and nutritionally induced changes in fetal metabolism in the horse. *The Journal of Physiology* **528** 209-219.

Fowden A, Gardner D, Ousey J, Giussani D et Forhead A (2005) Maturation of pancreatic β-cell function in the fetal horse during late gestation. *Journal of Endocrinology* **186** 467-473.

Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM et Burton GJ (2008) The placenta and intrauterine programming. *Journal of Neuroendocrinology* **20** 439-450.

Fowden A, Forhead A et Ousey J (2012) Endocrine adaptations in the foal over the perinatal period. *Equine Veterinary Journal* **44** 130-139.

Fox J et Weisberg S (2011) *An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition*. Sage.

Fradinho M, Correia M, Gracio V, Bliebernicht M, Farrim A, Mateus L, Martin-Rosset W, Bessa R, Caldeira R, Ferreira-Dias G *et al.* (2014) Effects of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive systems. *Theriogenology* **81** 1214-1222.

Franciolli ALR, Cordeiro BM, da Fonseca ET, Rodrigues MN, Sarmento CAP, Ambrosio CE, de Carvalho AF, Miglino MA et Silva LA (2011) Characteristics of the equine embryo and fetus from days 15 to 107 of pregnancy. *Theriogenology* **76** 819-832.

Frank N, Elliott S, Brandt L et Keisler D (2006) Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **228** 1383-1390.

Frank N, Geor R, Bailey S, Durham A et Johnson P (2010) Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **19** 1-13.

Frape D (1994) Diet and exercise performance in the horse. *Proceedings of the Nutrition Society* **53** 189-206.

Freinkel N, Metzger B, Nitzan M, Daniel R, Surmaczynska B et Nagel T (1974) Facilitated anabolism in late pregnancy: some novel maternal compensations for accelerated starvation. *Diabetes. International Series* 474.

French P, Stanton C, Lawless F, O'Riordan EG, Monahan FJ, Caffrey PJ et Moloney AP (2000) Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *Journal of Animal Science* **78** 2849-2855.

Friedrich C, König S, Rogers C et König von Borstel U (2013) Factors influencing longevity of New

Zealand dressage horses. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **8** e6.

Fritsche KL (2015) The Science of Fatty Acids and Inflammation. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **6** 293S-301S.

Frost A, Jonsson KB, Nilsson O et Ljunggren Ö (1997) Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthopaedica* **68** 91-96.

Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF et Karsenty G (2005) The Molecular Clock Mediates Leptin-Regulated Bone Formation. *Cell* **122** 803-815.

Fu Z, Gilbert E et Liu D (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews* **9** 25-53.

Fukao T, Lopaschuk G et Mitchell G (2004) Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **70** 243-251.

Fulzele K, Riddle R, DiGirolamo D, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere M-C, Aja S, Hussain M, Brüning J *et al.* (2010a) Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell* **142** 309-319.

Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere M-C, Aja S, Hussain MA, Brüning JC *et al.* (2010b) Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell* **142** 309-319.

Fumoto T, Takeshita S, Ito M et Ikeda K (2014) Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* **29** 830-842.

Gabel A, Knight DA, Reed SM, Pultz JA, Powers JD, Bramlage LR et Tyznik WJ (1988) Comparison of incidence and severity of developmental orthopedic disease on 17 farms before and after adjustment of ration. In *33rd Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*, p 163-169. American Association of Equine Practitioners.

Galea GL, Meakin LB, Sugiyama T, Zebda N, Sunters A, Taipaleenmaki H, Stein GS, van Wijnen AJ, Lanyon LE et Price JS (2013) Estrogen receptor α mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor β. *The Journal of biological chemistry* **288** 9035-9048.

Gallagher K, Leech J et Stowe H (1992) Protein, energy and dry matter consumption by racing

thoroughbreds: A field survey. *Journal of Equine Veterinary Science* **12** 43-48.

Gallo LA, Barrett HL et Nitert MD (2016) Review : Placental transport and metabolism of energy substrates in maternal obesity and diabetes. *Placenta* **In Press** 1-9.

da Gama M, Aspilcueta Borquis R, de Araújo Neto F, de Oliveira H, Fernandes G et da Mota M (2016) Genetic Parameters for Racing Performance of Thoroughbred Horses Using Bayesian Linear and Thurstonian Models. *Journal of Equine Veterinary Science* **42** 39-43.

Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ et Ye J (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor ??B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry* **277** 48115-48121.

Garcia M, Amstalden M, Williams SW, Stanko RL, Morrison CD, Keisler DH, Nizielski SE et Williams GL (2002) Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development , the estrous cycle , and different seasons in cattle 1. *Journal of ANimal Science* **80** 2158-2167.

García-mayor R, Andrade M, Rios M, Lage M, Dieguez C et Casanueva F (1997) Serum Leptin Levels in Normal Children : Serum Leptin Levels in Normal Children : Relationship to. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 2849-2855.

Gardner D, Tingey K, Van Bon B, Ozanne S, Wilson V, Dandrea J, Keisler D, Stephenson T et Symonds M (2005) Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **289** R947-R954.

Garlinghouse S et Burrill M (1999) Relationship of body condition score to completion rate during 160 km endurance races. *Equine Veterinary Journal. Supplement* **31** 591-595.

Garner HE, Hahn AW, Salem C, Coffman JR, Hutcheson DP et Johnson JH (1977) Cardiac output, left ventricular ejection rate, plasma volume, and heart rate changes in equine laminitis-hypertension. *American journal of veterinary research* **38** 725-729.

Ge Z-J, Liang Q-X, Hou Y, Han Z-M, Schatten H, Sun Q-Y et Zhang C-L (2014) Maternal obesity and diabetes may cause DNA methylation alteration in the spermatozoa of offspring in mice. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12** 29.

Gee EK, Grace ND, Firth EC et Fennessy PF (2000) Changes in liver copper concentration of thoroughbred foals from birth to 160 days of age and the effect of prenatal copper supplementation of their dams. *Australian Veterinary Journal* **78** 347-353.

Gee E, Firth E, Morel P, Fennessy P, Grace N et Mogg T (2005) Articular/epiphyseal osteochondrosis in thoroughbred foals at 5 months of age: influences of growth of the foal and prenatal copper supplementation of the dam. *New Zealand Veterinary Journal* **53** 448-456.

Gee E, Davies M, Firth E, Jeffcott L, Fennessy P et Mogg T (2007) Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams. *The Veterinary Journal* **173** 109-117.

GeF, Flachowsky G, Kamphues J, Rodehutscord M, Schenkel H, Staudacher W, Südekum K, Susenbeth A, Windisch W, Coenen M *et al.* (2014) *Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden - Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere Nr 11*. DLG-Verlag.

Genovese P, Núñez M, Pombo C et Bielli A (2010) Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of sertoli cells in the adult rat. *Reproduction in Domestic Animals* **45** 233-236.

Gentry L, Thompson D, Gentry G, Davis K, Godke R et Cartmill J (2002) The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *Journal of Animal Science* **80** 2695-2703.

Gentry L, Thompson D, Gentry G, Del Vecchio R, Davis K et Del Vecchio P (2004) The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mares of high versus low body condition. *Journal of Equine Veterinary Science* **24** 198-203.

Geor R (2008) Metabolic predispositions to laminitis in horses and ponies : obesity , insulin resistance and metabolic syndromes. *Journal of Equine Veterinary Science* **28** 753-759.

Geor R, Harris P et Coenen M (2013) *Equine applied and clinical nutrition : health, welfare and performance*. Saunders.

George L, Staniar W, Treiber K, Harris P et Geor R (2009) Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. *Domestic Animal Endocrinology* **37** 23-29.

German JP, Thaler JP, Wisse BE, Oh-I S, Sarruf DA, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ, Schwartz MW et Morton GJ (2011) Leptin Activates a Novel CNS Mechanism for Insulin-Independent Normalization of Severe Diabetic Hyperglycemia. *Endocrinology* **152** 394-404.

Gibbs P, Potter G, Blake R et McMullan W (1982) Milk production of quarter horse mares during 150 days of lactation. *Journal of animal science* **54** 496-499.

Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J et Nanes MS (2000) Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* **141** 3956-3964.

Giles S, Nicol C, Rands S et Harris P (2012) Fat all year round - The welfare consequences of continuous equine obesity. In *Recent advances in animal welfare science - UFAW Animal Welfare Conference*, p 33. Science in the Service of Animal Welfare.

Giles S, Harris P, Nicol C et Rands S (2013) Variation in body condition in small groups of horses. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **8** e6.

Giles S, Rands S, Nicol C et Harris P (2014) Obesity prevalence and associated risk factors in outdoor living domestic horses and ponies. *PeerJ* **2** e299.

Giles S, Nicol C, Rands S et Harris P (2015) Assessing the seasonal prevalence and risk factors for nuchal crest adiposity in domestic horses and ponies using the Cresty Neck Score. *BMC veterinary research* **11** 13.

Ginther OJ (1983) Fixation and orientation of the early equine conceptus. *Theriogenology* **19** 613-623.

Ginther O (1992) *Reproductive biology of the mare : basic and applied aspects*. Equiservice.

Giussani D, Forhead A, Gardner D, Fletcher A, Allen W et Fowden A (2003) Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *The Journal of Physiology* **547** 67-76.

Giussani D, Forhead A et Fowden A (2005) Development of cardiovascular function in the horse fetus. *The Journal of Physiology* **565** 1019-1030.

Glade M (1994) Nutrition and performance of racing Thoroughbreds. *The Journal of Nutrition* **124** S2745-S2753.

Glade M et Belling T (1986) A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. *Journal of Equine Veterinary Science* **6** 151-155.

Gloire G, Legrand-Poels S et Piette J (2006) NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* **72** 1493-1505.

Gluckman P et Hanson M (2004a) Living with the Past: Evolution, Development, and Patterns of Disease. *Science* **305** 1733-1736.

Gluckman P et Hanson M (2004b) Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Seminars*

in Fetal & Neonatal Medicine **9** 419-425.

Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD et Hanson MA (2007) Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatric Research* **61** 31-36.

González FD, Muiño R, Pereira V, Campos R et Benedito JL (2011) Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *Journal of Veterinary Science* **12** 251-255.

Gordeladze J, Drevon C, Syversen U et Reseland J (2002) Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *Journal of Cellular Biochemistry* **85** 825-836.

Gordon M, Mckeever K, Betros C et Filho H (2007) Plasma leptin, ghrelin and adiponectin concentrations in young fit racehorses versus mature unfit standardbreds. *The Veterinary Journal* **173** 91-100.

Gospodarowicz D (1972) Purification and physicochemical properties of the pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). *Endocrinology* **91** 101-106.

de Graaf-Roelfsema E (2014) Glucose homeostasis and the enteroinsular axis in the horse: A possible role in equine metabolic syndrome. *The Veterinary Journal* **199** 11-18.

Grayson BE, Levasseur PR, Williams SM, Smith MS, Marks DL et Grove KL (2010) Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. *Endocrinology* **151** 1622-1632.

van Grevenhof E, Ducro B, van Weeren P, van Tartwijk J, van den Belt A et Bijma P (2009) Prevalence of various radiographic manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch Warmblood horses. *Equine Veterinary Journal* **41** 11-16.

Groeneveld MP, Brierley G V, Rocha NM, Siddle K et Semple RK (2016) Acute knockdown of the insulin receptor or its substrates Irs1 and 2 in 3T3-L1 adipocytes suppresses adiponectin production. *Scientific reports* **6** 21105.

Grøndahl A (1991) The incidence of osteochondrosis in the tibiotarsal joint of Norwegian Standardbred trotters. *Journal of Equine Veterinary Science* **11** 272-274.

Grundberg E, Brändström H, Lam KCL, Gurd S, Ge B, Harmsen E, Kindmark A, Ljunggren O, Mallmin

H, Nilsson O *et al.* (2008) Systematic assessment of the human osteoblast transcriptome in resting and induced primary cells. *Physiological Genomics* **33** 301-311.

Gu W, Li X, Liu C, Yang J, Ye L, Tang J, Gu Y, Yang Y, Hong J, Zhang Y *et al.* (2006) Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations. *Endocrine* **30** 217-221.

Guillaume D, Salazar-Ortiz J et Martin-Rosset W (2006) Effects of nutrition level in mares' ovarian activity and in Equines' puberty. In *Nutrition and feeding the broodmare*, p 20-22.

Gunn R, Simms DA et Hunter E (1995) Effects of nutrition inutero and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two management systems. *Animal Science* **60** 223-230.

Guo Q, Li H, Xu L, Wu S, Sun H et Zhou B (2017) Undercarboxylated osteocalcin reverts insulin resistance induced by endoplasmic reticulum stress in human umbilical vein endothelial cells. *Scientific Reports* **7** 46.

Hadden D et McLaughlin C (2009) Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **14** 66-71.

Hadjidakis DJ et Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1092** 385-396.

Hales C et Barker D (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *International Journal of Epidemiology* **35** 595-601.

Hales CN, Desai M et Ozanne SE (1997) The thrifty phenotype hypothesis: How does it look after 5 years? *Diabetic Medicine* **14** 189-195.

Hammer CJ, Thorson JF, Meyer AM, Redmer DA, Luther JS, Neville TL, Reed JJ, Reynolds LP, Caton JS et Vonnahme KA (2011) Effects of maternal selenium supply and plane of nutrition during gestation on passive transfer of immunity and health in neonatal lambs. *Journal of Animal Science* **89** 3690-3698.

Hamrick M., Pennington C, Newton D, Xie D et Isales C (2004) Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone* **34** 376-383.

Han Y, Xu G, Zhang J, Yan M, Li X, Ma B, Jun L, Wang S-J et Tan J (2016) Leptin induces osteocalcin expression in ATDC5 cells through activation of the MAPK-ERK1/2 signaling pathway. *Oncotarget*

7 64021-64029.

Hansen A, Catalano D, Coleman R, Hathaway M, McCue M, Rendahl A et Martinson K (2015) Demographics, body condition scores, and owner bodyweight estimations of adult draft and warmblood horse breeds. *Journal of Equine Veterinary Science* **35** 389.

Hanson M et Gluckman P (2014) Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological Reviews* **94** 1027-1076.

Harada S et Rodan G a (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423** 349-355.

Harker I, Harris P et Barfoot C (2011) The body condition score of leisure horses competing at an unaffiliated championship in the UK. *Journal of Equine Veterinary Science* **31** 253-254.

Harris P (2010) Review of equine feeding and stable management practices in the UK concentrating on the last decade of the 20th Century. *Equine Veterinary Journal* **31** 46-54.

Harvey J, Asquith R, Patel M, Kivipelto J, Chen C et Ott E (1994) Haematological findings in pregnant, postparturient and nursing mares. *Comparative Haematology International* **4** 25-29.

Harvey J, Pate M, Kivipelto J et Asquith R (2005) Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. *Veterinary Clinical Pathology* **34** 248-254.

Hattori Y, Suzuki M, Hattori S et Kasai K (2003) Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia* **46** 1543-1549.

Hauschka P V et Carr SA (1982) Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* **21** 2538-2547.

Hauschka P V., Lian JB, Cole DE et Gundberg CM (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* **69**.

Hayes EK, Tessier DR, Percival ME, Holloway AC, Petrik JJ, Gruslin A et Raha S (2014) Trophoblast Invasion and Blood Vessel Remodeling Are Altered in a Rat Model of Lifelong Maternal Obesity. *Reproductive Sciences* **21** 648-657.

He Q, Ren P, Kong X, Wu Y, Wu G, Li P, Hao F, Tang H, Blachier F et Yin Y (2012) Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR-based metabonomic approach. *Journal of Nutritional Biochemistry* **23** 133-139.

Heasman L, Symonds ME, Clarke L, Heasman L, Juniper DT et Symonds ME (1998) Maternal nutrition in early-mid gestation and placental size in sheep Maternal nutrition in early-mid gestation and placental size in sheep. *British Journal of Nutrition* **79** 359-364.

Heck L, Clauss M et Sánchez-Villagra MR (2017) Gestation length variation in domesticated horses and its relation to breed and body size diversity. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* **84** 44-51.

Hendrickson E, Olstad K, Nødtvedt A, Pauwels E, Hoorebeke L et Dolvik N (2015) Comparison of the blood supply to the articular-epiphyseal growth complex in horse vs . pony foals. *Equine Veterinary Journal* **47** 326-332.

Henneke D, Polter G, Kreider J et Yeates B (1983) Relationship between condition score , physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal* **15** 371-372.

Henneke D, Potter G et Kreider J (1984) Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology* **21** 897-909.

Henquin J-C, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier M et Jonas J-C (2002) Signals and Pools Underlying Biphasic Insulin Secretion. **51**.

Henson F, Davenport C, Butler L, Moran I, Shingleton W, Jeffcott L et Schofield P (1997a) Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine veterinary journal* **29** 441-447.

Henson FM, Davies ME et Jeffcott LB (1997b) Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)--histological findings and type VI collagen localization. *Veterinary journal* **154** 53-62.

Hervouet C (2012) Étude de la faisabilité du suivi de l'état corporel par échographie, sur le terrain, chez le cheval de sport. Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique - ONIRIS.

Hess R, Pino AM, Ríos S, Fernández M et Rodríguez JP (2005) High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *Journal of Cellular Biochemistry* **94** 50-57.

Vander Heyden L, Serteyn D, Caudron I, Verwilghen D, Deliege B et Lejeune J (2008) Prévalence de l'ostéochondrose chez le cheval de sport en Wallonie. *Annales de Médecine Vétérinaire* **152** 61-70.

Vander Heyden L, Lejeune J-P, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, Paris J, Deliège B et Serteyn D (2012) Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Veterinary Record* **172** 68.

Vander Heyden L, Lejeune J-P, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, Paris J, Deliège B et Serteyn D (2013) Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Veterinary Record* **172** 68 LP-68.

Hildebran S et Hunt J (1993) Copper-responsive epiphytis and tendon contracture in a foal. In *The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition*, p 400-410. Éd H Ashmead. Noyes Publications.

Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Kajimura D, Myers MG, Chua SC, Wang Q, Kim JK *et al.* (2009) An osteoblast-dependent mechanism contributes to the leptin regulation of insulin secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173**.

Hintz H, Hintz R et Dale Van Vleck L (1979) Growth rate of Thoroughbreds. Effect of age of dam, year, and month of birth, and sex of foal. *Journal of Animal Science* **48** 480-487.

Hirschmugl B, Desoye G, Catalano P, Klymiuk I, Scharnagl H, Payr S, Kitzinger E, Schliefsteiner C, Lang U et Wadsack C (2016) Maternal obesity modulates intracellular lipid turnover in the human term placenta. *Nature* **41** 317-323.

Hitchens P, Hultgren J, Frössling J, Emanuelson U et Keeling L (2016) Prevalence and risk factors for overweight horses at premises in Sweden assessed using official animal welfare control data. *Acta Veterinaria Scandinavica* **58** 61.

Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ et Yang DSC (2003) Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* **425** 977-980.

Hodge L, Rude B, Dinh T et Lemley C (2017) Effect of ω-3 fatty acid supplementation to gestating and lactating mares: on milk IgG, mare and foal blood concentrations of IgG, insulin and glucose, placental efficiency, and fatty acid composition of milk and serum from mares and foals1. *Journal of Equine Veterinary Science* **51** 70-78.

Hoffman RM, Morgan KL, Lynch MP, Zinn SA, Faustman C et Harris PA (1999) Dietary vitamin E supplemented in the periparturient period influences immunoglobulins in equine colostrums and passive transfer in foals. In *16th Equine Nutrition and Physiology Symposium*, p 96-97.

Hoffman R, Boston R, Stefanovski D, Kronfeld D et Harris P (2003a) Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *Journal of Animal Science* **81**

2333-2342.

Hoffman R, Boston R, Stefanovski D, Kronfeld D et Harris P (2003b) Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *Journal of animal science* **81** 2333-2342.

Hoffman C, Costa L et Freeman L (2009) Survey of Feeding Practices, Supplement Use, and Knowledge of Equine Nutrition among a Subpopulation of Horse Owners in New England. *Journal of Equine Veterinary Science* **29** 719-726.

Hoffman ML, Rokosa MA, Zinn SA, Hoagland TA et Govoni KE (2014) Poor maternal nutrition during gestation in sheep reduces circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in offspring. *Domestic Animal Endocrinology* **49** 39-48.

Hoffman ML, Peck KN, Forella ME, Fox AR, Govoni KE et Zinn SA (2016) The effects of poor maternal nutrition on postnatal growth and development of lambs development of lambs. *Journal of Animal Science* **94** 789-799.

Holbrook TC, Tipton T et McFarlane D (2012) Neutrophil and cytokine dysregulation in hyperinsulinemic obese horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **145** 283-289.

Holdstock N, Allen V, Bloomfield M, Hales C et Fowden A (2004) Development of insulin and proinsulin secretion in newborn pony foals. *Journal of Endocrinology* **181** 469-476.

Holmström M et Philipsson J (1993) Relationships between conformation, performance and health in 4-year-old swedish warmblood riding horses. *Livestock Production Science* **33** 293-312.

Honoré E et Uhlinger C (1994) Equine feeding practices in central north carolina: a preliminary survey. *Journal of equine veterinary science* **14** 425-429.

Horwitz D, Starr J, Mako M, Blackard W et Rubenstein A (1975) Proinsulin, insulin and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *Journal of Clinical Investigation* **55** 1278-1283.

Hotamisligil G, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White M et Spiegelman B (1996) IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-α and obesity induced insulin resistance. *Science* **271** 665-668.

Houseknecht K, Portocarrero C, Ji S, Lemenager R et Spurlock M (2000) Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: Correlation with adipose IGF-1 expression.

Journal of Endocrinology **164** 51-57.

Houstis N, Rosen ED et Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440** 944-948.

Howell K et Powell T (2017) Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction* **153** 97-108.

Hribal M, Fiorentino T et Sesti G (2014) Role of C Reactive Protein (CRP) in Leptin Resistance. *Current Pharmaceutical Design* **20** 609-615.

Huang X et Arvan P (1995) Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *The Journal of biological chemistry* **270** 20417-20423.

Huang Y, Zhao JX, Yan X, Zhu MJ, Long NM, McCormick RJ, Ford SP, Nathanielsz PW et Du M (2012) Maternal obesity enhances collagen accumulation and cross-linking in skeletal muscle of ovine offspring. *PLoS ONE* **7** 1-8.

Huff N, Thompson D, Gentry L et Depew C (2008) Hyperleptinemia in Mares : Prevalence in Lactating Mares and Effect on Rebreeding Success. *Journal of Equine Veterinary Science* **28** 579-586.

Hughes S, Potter G, Greene L, Odom T et Murray-Grzik M (1995) Adaptation of Thoroughbred horses in training to a fat supplemented diet. *Equine Veterinary Journal* **18** 349-352.

Hughes C, Xie M, Mccoski S et Ealy A (2017) Domestic Animal Endocrinology Activities for leptin in bovine trophoblast cells. *Domestic Animal Endocrinology* **58** 84-89.

Hunka MM, Rodrigues da Silva ER, Kutschenko M, Terra Nogueira E, Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso HE et Cordeiro Manso Filho H (2016) Effects of L-arginine supplementation on lactating mares and the development of foals. *Acta Scientiae veterinariae* **44** 1352.

Hurtig M, Green SL, Dobson H, Mikuni-Takagaki Y et Choi J (1993) Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. *Equine Veterinary Journal* **25** 66-73.

Hwang Y-C, Jeong I-K, Ahn KJ et Chung HY (2009) The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced β-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **25** 768-772.

Hwang Y-C, Jee J-H, Jeong I-K, Ahn KJ, Chung HY et Lee M-K (2012) Circulating Osteocalcin Level Is Not Associated With Incident Type 2 Diabetes in Middle-Aged Male Subjects. *Diabetes Care* **35**.

Hyatt MA, Gardner DS, Sebert S, Wilson V, Davidson N, Nigmatullina Y, Chan LLY, Budge H et Symonds ME (2011) Suboptimal maternal nutrition, during early fetal liver development, promotes lipid accumulation in the liver of obese offspring. *Reproduction* **141** 119-126.

Imamura T, Huang J, Usui I, Satoh H, Bever J et Olefsky J (2003) Involves Protein Kinase C- λ -Mediated Functional Coupling between Rab4 and the Motor Protein Kinesin Insulin-Induced GLUT4 Translocation Involves Protein Kinase C- -Mediated Functional Coupling between Rab4 and the Motor Protein Kinesin. *Mol Cell Biol* **23** 4892–4900.

Ireland J, Clegg P, Mcgowan C, Mckane S, Chandler K et Pinchbeck G (2012) Comparison of owner-reported health problems with veterinary assessment of geriatric horses in the United Kingdom. *Equine Veterinary Journal* **44** 94-100.

Ireland J, Wylie C, Collins S, Verheyen K et Newton J (2013) Preventive health care and owner-reported disease prevalence of horses and ponies in Great Britain. *Research in Veterinary Science* **95** 418-424.

Irwin D et Prentice K (2011) Incretin hormones and the expanding families of glucagon-like sequences and their receptors. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **13** 69-81.

Isaksson O, Jansson J et Gause I (1982) Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* **216**.

Isgaard J, Möller C, Isaksson OG, Nilsson A, Mathews LS et Norstedt G (1988) Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. *Endocrinology* **122** 1515-1520.

Islam A, Kodama T, Yamamoto Y, Ebrahimi M, Miyazaki H, Yasumoto Y, Kagawa Y, Sawada T, Owada Y et Tokuda N (2016) Omega-3 fatty acids transport through the placenta. *Asian Journal of Medical and Biological Research* **2** 1.

Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K, Fu Y, Motone M, Yamamoto K, Matsuo A *et al.* (2004) Hypoadiponectinemia Is an Independent Risk Factor for Hypertension. *Hypertension* **43** 1318-1323.

Jackuliak P et Payer J (2014) Osteoporosis, fractures, and diabetes. *International Journal of Endocrinology* **2014**.

Jacobsen S et Andersen PH (2007) The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education* **19** 38-46.

Jacquet S, Robert C, Valette J-P et Denoix J-M (2013) Evolution of radiological findings detected in the limbs of 321 young horses between the ages of 6 and 18 months. *The Veterinary Journal* **197** 58-64.

Jain RG, Phelps KD et Pekala PH (1999) Tumor necrosis factor-α initiated signal transduction in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of cellular physiology* **179** 58-66.

Jammes H, Junien C et Chavatte-Palmer P (2011) Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. In *Reproduction, Fertility and Development*, p 64-74.

Jansonn A (2011) *Utfodringsrekommendationer för häst*.

Jansson T et Powell TL (2006) Human Placental Transport in Altered Fetal Growth: Does the Placenta Function as a Nutrient Sensor? - A Review. *Placenta* **27** 91-97.

Jansson T et Powell T (2007) Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical Science (London, England: 1979)* **113** 1-13.

Jansson A, Stéfansdóttir G et Ragnarsson S (2016) Plasma insulin concentration increases linearly with body condition in Icelandic horses. *Acta Veterinaria Scandinavica* **58** 76.

Jarrige R, Petit M, Tissier M et Guegen L (1978) Reproduction, gestation et lactation. In *Alimentation des ruminants*, p 229-243. Versailles: INRA publication.

Jarvie E, Hauguel-De-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM et Freeman DJ (2010) Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clinical Science* **119** 123-129.

Jeffcott L (1974) Some Practical Aspects of the Transfer of Passive Immunity to Newborn Foals. *Equine Veterinary Journal* **6** 109-115.

Jeffcott L et Henson F (1998) Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (osteochondrosis). *The Veterinary Journal* **156** 177-192.

Jensen R, Danielsen S et Tauson A-H (2015) The prevalence of obesity in mature Icelandic horses in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica* **57** 2015.

Jockenhövel F, Blum WF, Vogel E, Englaro P, Müller-Wieland D, Reinwein D, Rascher W et Krone W (1997) Testosterone Substitution Normalizes Elevated Serum Leptin Levels in Hypogonadal Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82** 2510-2513.

Johnson L (1995) Efficiency of spermatogenesis. *Microscopy Research and Technique* **32** 385-422.

Johnston RH, Kamstra LD et Kohler PH (1970) Mares' milk composition as related to « foal heat » scours. *Journal of animal science* **31** 549-553.

Jones D, Potter G, Greene L et Odom T (1992) Muscle glycogen in exercised miniature horses at various body conditions and fed a control or fat-supplemented diet. *Equine Nutrition and Physiology Society* **12** 287-291.

Jose-Cunilleras E, Hayes K, Toribio R, Mathes L et Hinchcliff K (2005) Expression of equine glucose transporter type 4 in skeletal muscle after glycogen-depleting exercise. *American Journal of Veterinary Research* **66** 379-385.

Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P et McClain CJ (2007) Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* **46** 823-830.

Joubert D et Hamond J (1958) A crossbreeding experiment with cattle, with special reference to maternal effect in south devon-dexter crosses. *Journal of Agricultural Science* **51** 325-341.

Jouven M, Launay F, Geiger A, Guillaume C et Jouven M (2013) Place des parcours dans les élevages équins du Sud de la France ; cas des élevages endurance (race PSA) et Camargue en Languedoc-Roussillon. In *39ème Journée de la Recherche Equine*, p 85-94. Paris: Institut français du cheval et de l'équitation.

Jrgensen H, Proschowskyt H, Nne J, Willebergq P et Hesselholt M (1997) The significance of routine radiographic findings with respect to subsequent racing performance and longevity in Standard bred trotters. *Equine Veterinary Journal* **29** 55-59.

Kajimura D, Lee H, Riley K, Arteaga-Solis E, Ferron M, Zhou B, Clarke C, Hannun Y, Depinho R, Guo E *et al.* (2013) Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through foxo1. *Cell Metabolism* **17** 901-915.

Kamal MM, Van Eetvelde M, Depreester E, Hostens M, Vandaele L et Opsomer G (2014) Age at calving in heifers and level of milk production during gestation in cows are associated with the birth size of Holstein calves. *Journal of dairy science* **97** 5448-5458.

Kamal MM, Van Eetvelde M, Bogaert H, Hostens M, Vandaele L, Shamsuddin M et Opsomer G (2015) Environmental factors and dam characteristics associated with insulin sensitivity and insulin secretion in newborn Holstein calves. *Animal : an international journal of animal bioscience* **9**

1490-1499.

Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Yamamoto M et Sugimoto T (2007) Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *BMC Cell Biology* **8** 51.

Kane R, Fisher M, Parrett D et Lawrence L (1987) Estimating fatness in horses. In *Proceedings of the 10th Equine Nutrition and Physiology Symposium*, p 31.

Kane A, Mcilwraith C, Park R, Rantanen N, Morehead J et Bramlage L (2003) Radiographic changes in Thoroughbred yearlings . Part 2 : Associations with racing performance. *Equine Veterinary Journal* **35** 366-374.

Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Higuchi C, Hirao M, Okamoto M, Koizumi K, Morimoto T, Yoshikawa H et Hashimoto J (2014) IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **32** 378-392.

Kang S, Tsai LTY et Rosen ED (2016) Nuclear Mechanisms of Insulin Resistance. *Trends in Cell Biology* **26** 341-351.

Kappes A et Löffler G (2000) Influences of Ionomycin, Dibutyryl-cycloAMP and Tumour Necrosis Factor-alpha on Intracellular Amount and Secretion of apM1 in Differentiating Primary Human Preadipocytes. *Hormone and Metabolic Research* **32** 548-554.

Karren B, Thorson J, Cavinder C, Hammer C et Coverdale J (2010) Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: Selenium concentrations and glutathione peroxidase. *Journal of Animal Science* **88** 991-997.

Karsenty G (2006) Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metabolism* **4** 341-348.

Karsenty G (2011a) Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. *Comptes Rendus - Biologies* **334** 720-724.

Karsenty G (2011b) Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. *Comptes Rendus - Biologies* **334** 720-724.

Karsenty G et Oury F (2014) Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Molecular and Cellular Endocrinology* **382** 521-526.

Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi

K *et al.* (2007) Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS ONE* **2** e1058.

Kawashima C, Munakata M, Shimizu T, Miyamoto A, Kida K et Matsui M (2016) Relationship between the degree of insulin resistance during late gestation and postpartum performance in dairy cows and factors that affect growth and metabolic status of their calves. *Journal of Veterinary Medical Science* **78** 739-745.

Kearns CF, McKeever KH et Abe T (2002a) Overview of horse body composition and muscle architecture: implications for performance. *The Veterinary Journal* **164** 224-234.

Kearns C, McKeever K, John-Alder H, Abe T et Brechue W (2002b) Relationship between body composition, blood volume and maximal oxygen uptake. *Equine Veterinary Journal* **34** 485-490.

Kearns C, Mckeever K, Kumagai K et Abe T (2002c) Fat-free mass is related to one-Mile race performance in elite standardbred horses. *Veterinary Journal* **163** 260-266.

Kearns C, McKeever K et Abe T (2002d) Overview of horse body composition and muscle architecture: implications for performance. *The Veterinary Journal* **164** 224-234.

Kearns C, McKeever K, Roegner V, Brady S et Malinowski K (2006) Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Veterinary Journal* **172** 460-465.

Keelan J, Ravelich S, Shelling A, Ramachandran A, Reddy S, Keelan J, Wells D, Peterson A, Lee R et Breier B (2004) Altered Placental Lactogen and Leptin Expression in Placentomes from Bovine Nuclear Transfer Pregnancies. *Biology of Reproduction* **71** 1862-1869.

Kershaw E, Flier J, Musi N et Guardado-Mendoza R (2014) Adipose Tissue as an Endocrine Organ. In *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, p 229-237. Elsevier Inc.

Kerstjens JM, de Winter AF, Sollie KM, Bocca-Tjeertes IF, Potijk MR, Reijneveld SA et Bos AF (2013) Maternal and pregnancy-related factors associated with developmental delay in moderately preterm-born children. *Obstetrics and gynecology* **121** 727-733.

Kertz AF, Reutzel LF, Barton BA et Ely RL (1997) Body Weight, Body Condition Score, and Wither Height of Prepartum Holstein Cows and Birth Weight and Sex of Calves by Parity: A Database and Summary. *Journal of dairy science* **80** 525-529.

Kessler J, Koebnick C, Smith N et Adams A (2013) Childhood Obesity Is Associated With Increased Risk of Most Lower Extremity Fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research®* **471** 1199-1207.

Khanal P, Husted S V., Axel AMD, Johnsen L, Pedersen KL, Mortensen MS, Kongsted AH et Nielsen

MO (2014) Late gestation over- and undernutrition predispose for visceral adiposity in response to a post-natal obesogenic diet, but with differential impacts on glucose-insulin adaptations during fasting in lambs. *Acta Physiologica* **210** 110-126.

Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik D et Cnop M (2003) Expression of adiponectin receptors in pancreatic β cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312** 1118-1122.

Khireddine B, Grimard B, Ponter AA, Ponsart C, Boudjenah H, Mialot JP, Sauvant D et Humblot P (1998) Influence of flushing on lh secretion, follicular growth and the response to estrus synchronization treatment in suckled beef cows. *Theriogenology* **49** 1409-1423.

Kienzle E et Schramme S (2004) Body Condition Scoring and prediction of body weight in adult Warm blooded horses. *Pferdeheilkunde* **20** 517-524.

Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong JY, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB *et al.* (2004) Differential effects of interleukin-6 and-10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* **53** 1060-1067.

Kim ST, Marquard K, Stephens S, Louden E, Allsworth J et Moley KH (2011) Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus. *Human Reproduction* **26** 82-95.

Kimura A, Baumann C, Chiang S et Saltiel A (2001) The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** 9098-9103.

Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren Ö, Karlsson MK, Tivesten Å, Smith U et Mellström D (2009) Plasma Osteocalcin Is Inversely Related to Fat Mass and Plasma Glucose in Elderly Swedish Men. *Journal of Bone and Mineral Research* **24** 785-791.

King SS, AbuGhazaleh AA, Webel SK et Jones KL (2007) Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. *Journal of Animal Science* **86** 1114-1123.

Kinsley M, Semevolos S et Duesterdieck-Zellmer K (2015) Wnt/β-catenin signaling of cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes and full thickness cartilage in early equine osteochondrosis. *Journal of Orthopaedic Research* **33** 1433-1438.

Kirat D, Hamid N, Mohamed W, Hamada M et Shalaby S (2015) Leptin Gene Expression in Rabbits During Pregnancy and Fetal Life. *International Journal of Biology* **7** 113-125.

Kirchgessner TG, Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW et Hotamisligil GS (1997) Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *The Journal of clinical investigation* **100** 2777-2782.

Kirmani S, Atkinson E, Melton L, Riggs B, Amin S et Khosla S (2011) Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *Journal of Bone and Mineral Research* **26** 2212-2216.

Kishida Y, Hirao M, Tamai N, Nampei A, Fujimoto T, Nakase T, Shimizu N, Yoshikawa H et Myoui A (2005) Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification. *Bone* **37** 607-621.

Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W *et al.* (1999) Insulin-Induced Phosphorylation and Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3B by the Serine-Threonine Kinase Akt. **19** 6286-6296.

Kleemann DO, Kelly JM, Rudiger SR, McMillen IC, Morrison JL, Zhang S, MacLaughlin SM, Smith DH, Grimson RJ, Jaensch KS *et al.* (2015) Effect of periconceptional nutrition on the growth, behaviour and survival of the neonatal lamb. *Animal Reproduction Science* **160** 12-22.

Klewitz J, Struebing C, Rohn K, Goergens A, Martinsson G, Orgies F, Probst J, Hollinshead F, Bollwein H et Sieme H (2015) Effects of age, parity, and pregnancy abnormalities on foal birth weight and uterine blood flow in the mare. *Theriogenology* **83** 721-729.

Klok M, Jakobsdottir S et Drent M (2007) The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review. *Obesity Reviews* **8** 21-34.

Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG et Mooney RA (2003) Chronic Exposure to Interleukin-6 Causes Hepatic Insulin Resistance in Mice. *Diabetes* **52** 2784-2789.

Knight D, Gabel AA, Reed SM, Embertson RM, Tyznik WJ et Bramlage LR (1985) Correlation of dietary mineral to incidence and severity of metabolic bone disease in Ohio and Kentucky. In *31st Annual convention of the American Association of Equine Practitioners*, p 445-460. American Association of Equine Practitioners.

Knight D, Weisbrode S, Schmall L, Reed S, Gabel A, Bramlage L et Tyznik W (1990) The effects of copper supplementation on the prevalence of cartilage lesions in foals. *Equine Veterinary Journal* **22** 426-432.

Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T et Matsuzawa Y (2004) Selective Suppression of Endothelial Cell Apoptosis by the High Molecular Weight Form of

Adiponectin. *Circulation Research* **94** 27e-31.

Kode A, Mosialou I, Silva BC, Joshi S, Ferron M, Rached MT et Kousteni S (2012) FoxO1 protein cooperates with ATF4 protein in osteoblasts to control glucose homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **287** 8757-8768.

Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine R V, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J et Caro JF (1996) Acute and Chronic Effect of Insulin on Leptin Production in Humans: Studies In Vivo and In Vitro. *Diabetes* **45**.

Koletzko B (2005) Developmental origins of adult disease: Barker's or Dörner's hypothesis? *American Journal of Human Biology* **17** 381-382.

De Koster JD et Opsomer G (2013) Insulin resistance in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **29** 299-322.

Kotsampasi B, Balaskas C, Papadomichelakis G et Chadio S (2009) Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Animal Reproduction Science* **114** 135-147.

Kream B, Smith M, Canalis E et Raisz L (1985) Characterization of the effect of insulin on collagen sythesis in fetal rat bone. *Endocrinology* **116** 296-302.

Kriström B, Carlsson B, Rosberg S, Carlsson LMS et Albertsson-Wikland K (1998) Short-Term Changes in Serum Leptin Levels Provide a Strong Metabolic Marker for the Growth Response to Growth Hormone Treatment in Children [1]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **83** 2735-2741.

Krohn K, Haffner D, Hügel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O et Schaefer F (2003) 1,25(OH)2D3 and Dihydrotestosterone Interact to Regulate Proliferation and Differentiation of Epiphyseal Chondrocytes. *Calcified Tissue International* **73** 400-410.

Kubiak J, Evans J, Potter G, Harms P et Jenkins W (1988) Parturition in the multiparous mare fed to obesity. *Equine Veterinary Science* **8** 135-140.

Kubiak JRR, Evans JWW, Potter GDD, Harms PGG et Jenkins WLL (1991) Milk yield composition in the multiparous mare fed to obesity. *Equine Veterinary Science* **11** 158-162.

Kuhl J, Winterhoff N, Wulf M, Schweigert FJ, Schwendenwein I, Bruckmaier RM, Aurich JE, Kutzer P et Aurich C (2011) Changes in faecal bacteria and metabolic parameters in foals during the first

six weeks of life. *Veterinary Microbiology* **151** 321-328.

Kular J, Tickner J, Chim SM et Xu J (2012) An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry* **45** 863-873.

Kume S et Tanabe S (1993) Effect of parity on colostral mineral concentrations of Holstein cows and value of colostrum as a mineral source for newborn calves. *Journal of dairy science* **76** 1654-1660.

Kuntz R, Kubalek C, Ruf T, Tataruch F, Arnold W, Ruf T et Kuntz R (2006) Seasonal adjustment of energy budget in a large wild mammal, the Przewalski horse (Equus ferus przewalskii). *Journal of Experimental Biology* **209** 4566-4573.

Kuroki T, Shingu M, Koshihara Y et Nobunaga M (1994) Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. *Rheumatology* **33** 224-230.

Kuypers E, Ophelders D, Jellema RK, Kunzmann S, Gavilanes AW et Kramer BW (2012) White matter injury following fetal inflammatory response syndrome induced by chorioamnionitis and fetal sepsis: Lessons from experimental ovine models. *Early Human Development* **88** 931-936.

Laakso M et Kuusisto J (2014) Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nature reviews. Endocrinology* **10** 293-302.

de Laat M, Clement C, Sillence M, Mcgowan C, Pollitt C et Lacombe V (2015) The impact of prolonged hyperinsulinaemia on glucose transport in equine skeletal muscle and digital lamellae. *Equine Veterinary Journal* **47** 494-501.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S *et al.* (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93** 165-176.

Lacombe V (2014) Expression and regulation of facilitative glucose transporters in equine insulin-sensitive tissue: from physiology to pathology. *ISRN veterinary science* **2014** 409547.

Lacombe V, Hinchcliff K et Taylor L (2003) Interactions of substrate availability, exercise performance, and nutrition with muscle glycogen metabolism in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **223** 1576-1585.

Lager S, Ramirez VI, Powell TL, Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Jang B, Jansson T et Powell TL (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** 60-66.

Lam QLK et Lu L (2007) Role of leptin in immunity. *Cellular & molecular immunology* **4** 1-13.

Landman RE, Puder JJ, Xiao E, Freda PU, Ferin M et Wardlaw SL (2003) Endotoxin Stimulates Leptin in the Human and Nonhuman Primate. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88** 1285-1291.

Lange-consiglio A, Arrighi S, Fiandanese N, Pocar P, Aralla M, Bosi G, Borromeo V, Berrini A, Meucci A, Dell Aquila M *et al.* (2013) Follicular fluid leptin concentrations and expression of leptin and leptin receptor in the equine ovary and in vitro -matured oocyte with reference to pubertal development and breeds. *Reproduction, Fertility and Development* **25** 837-846.

Langlois B, Blouin C, Perrocheau M et Chaffaux S (2006) Influence of radiographic osteochondrosis status at 16-18 months , on racing performances in French trotters. *Pfer* **22** 461-464.

Lansade L, Philippon P, Hervé L et Vidament M (2016) Development of personality tests to use in the field, stable over time and across situations, and linked to horses' show jumping performance. *Applied Animal Behaviour Science* **176** 43-51.

Laporte-Broux B, Roussel S, Ponter A, Perault J, Chavatte-Palmer P et Duvaux-Ponter C (2011) Short-term effects of maternal feed restriction during pregnancy on goat kid morphology , metabolism , and behavior. *Journal of Animal Science* **89** 2154-2163.

Laporte-Broux B, Roussel S, Ponter A, Giger-Reverdin S, Camous S, Chavatte-Palmer P et Duvaux-Ponter C (2012) Long-term consequences of feed restriction during late pregnancy in goats on feeding behavior and emotional reactivity of female offspring. *Physiology and Behavior* **106** 178-184.

Latman N, Keith N, Nicholson A et Davis M (2011) Bioelectrical impedance analysis determination of water content and distribution in the horse. *Research in Veterinary Science* **90** 516-520.

Lawrence L, DiPietro J, Ewert K, Parrett D, Moser L et Powell D (1992a) Changes in body weight and condition of gestating mares. *Journal of Equine Veterinary Science* **12** 355-358.

Lawrence L, Jackson S, Kline K, Moser L, Powell D et Biel M (1992b) Observations in body weight and condition of horses in a 150-mile endurance ride. *Equine Veterinary Science* **12** 320-324.

Laws E, Richardson D, Ross M et Moyer W (1993) Racing performance of Standardbreds after conservative and surgical treatment for tarsocrural osteochondrosis. *Equine Veterinary Journal*

25 199-202.

Lê S, Josse J et Husson F (2008) **FactoMineR** : An *R* Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* **25** 1-18.

Lecocq M, Girard C, Fogarty U, Beauchamp G, Richard H et Laverty S (2008) Cartilage matrix changes in the developing epiphysis : Early events on the pathway to equine osteochondrosis ? *Equine Veterinary Journal* **40** 442-454.

Lee NJ et Herzog H (2009) NPY regulation of bone remodelling. *Neuropeptides* **43** 457-463.

Lee N, Soa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn J, Confavreux C, Dacquin R, Mee P, McKee M, Jung D *et al.* (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* **130** :456-469.

Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi J-Y et Kim JB (2009) Adiponectin Stimulates Osteoblast Differentiation Through Induction of COX2 in Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells* **27** 2254-2262.

Lee DK, Jeong JH, Chun S-K, Chua Jr. S et Jo Y-H (2015) Interplay between glucose and leptin signalling determines the strength of GABAergic synapses at POMC neurons. *Nature Communications* **6** 6618.

Legacki E, Scholtz E, Ball B, Stanley S, Berger T et Conley A (2016) The dynamic steroid landscape of equine pregnancy mapped by mass spectrometry. *Reproduction* **151** 421-430.

Lenchik L, Register T., Hsu F-C, Lohman K, Nicklas B., Freedman B., Langefeld C., Carr J. et Bowden D. (2003) Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone* **33** 646-651.

Lennard SN, Stewart F et Allen WR (1995) Insulin-like growth factor II gene expression in the fetus and placenta of the horse during the first half of gestation. *Journal of reproduction and fertility* **103** 169-179.

Lepage OM, Marcoux M et Tremblay A (1990) Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **54** 223-226.

Lepage OM, Marcoux M, Tremblay A et Dumas G (1992) Sex does not influence serum osteocalcin levels in standardbred horses of different ages. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **56** 379-381.

Lepeule J, Bareille N, Robert C, Ezanno P, Valette J-P, Jacquet S, Blanchard G, Denoix J-M et Seegers H (2009) Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the prevalence of Developmental Orthopaedic Disease in limbs of French foals at weaning. *Preventive Veterinary Medicine* **89** 167-177.

Leury BJ, Baumgard LH, Block SS, Segoale N, Ehrhardt RA, Rhoads RP, Bauman DE, Bell AW et Boisclair YR (2003) Effect of insulin and growth hormone on plasma leptin in periparturient dairy cows. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **285**.

Leviton A (1993) Preterm birth and cerebral palsy: is tumor necrosis factor the missing link? *Developmental medicine and child neurology* **35** 553-558.

Li YP et Stashenko P (1992) Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter. *The Journal of Immunology* **148**.

Liburt N (2011) Effects of age and training on the cytokine, myokine and endocrine regulation of glucose metabolism in standardbred mares. University of New Jersey.

De Liefde I, Van Der Klift M, De Laet C, Van Daele P, Hofman A et Pols H (2005) Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: The Rotterdam Study. *Osteoporosis International* **16** 1713-1720.

Lin GL et Hankenson KD (2011) Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* **112** 3491-3501.

Lin Y, Rajala MW, Berger JP, Moller DE, Barzilai N et Scherer PE (2001) Hyperglycemia-induced Production of Acute Phase Reactants in Adipose Tissue. *Journal of Biological Chemistry* **276** 42077-42083.

Lin L-Y, Lin C-Y, Su T-C et Liau C-S (2004) Angiotensin II-induced apoptosis in human endothelial cells is inhibited by adiponectin through restoration of the association between endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 90. *FEBS Letters* **574** 106-110.

Lin Y, Chen C, Chuang T, Lin Y, Liu H, Mersmann H, Wu S et Ding S (2014) Adiponectin receptor 1 regulates bone formation and osteoblast differentiation by GSK-3β/β-Catenin signaling in mice. *Bone* **64** 147-154.

Liu Q, Howard AD, Wang R, Pong S-S, Mellin TN, Strack A, Guan X-M, Zeng Z, Williams DL, Feighner SD *et al.* (2000) Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature* **406** 70-74.

Liu Y, Petreaca M et Martins-Green M (2009) Cell and molecular mechanisms of insulin-induced angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13** 4492-4504.

Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW *et al.* (1998) Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB Journal* **12** 57-65.

Long NM, Vonnahme KA, Hess BW, Nathanielsz PW et Ford SP (2009) Effects of early gestational undernutrition on fetal growth, organ development, and placentomal composition in the bovine. *Journal of Animal Science* **87** 1950-1959.

Long NM, George LA, Uthlaut AB, Smith DT, Nijland MJ, Nathanielsz PW et Ford SP (2010) Maternal obesity and increased nutrient intake before and during gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in adult offspring. *Journal of Animal Science* **88** 3546-3553.

Long N, Rule D, Tuersunjiang N, Nathanielsz P et Ford S (2015) Maternal obesity in sheep increases fatty acid synthesis, upregulates nutrient transporters, and increases adiposity in adult male offspring after a feeding challenge. *PLoS ONE* **10** e0122152.

Longo LD (2011) Respiratory Gas Exchange in the Placenta. *Comprehensive Physiology* **13** 351-401.

Lopez-Tello J, Arias-Alvarez M, Jimenez-Martinez M-A, Garcia-Garcia R-M, Rodriguez M, Lorenzo Gonzalez P, Bermejo-Poza R, Gonzalez-Bulnes A et Garcia Rebollar P (2017) Competition for Materno-Fetal Resource Partitioning in a Rabbit Model of Undernourished Pregnancy. *PLOS ONE* **12** e0169194.

Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D et Palin MF (2005) Expression of adiponectin and its receptors in swine. *Journal of Animal Science* **83** 565-578.

De Lorenzo A, Andreoli A, Matthie J et Withers P (1997) Predicting body cell mass with bioimpedance by using theoretical methods: a technological review. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **82** 1542-1558.

Low M (2004) The somatostatin neuroendocrine system: Physiology and clinical relevance in gastrointestinal and pancreatic disorders. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* **18** 607-622.

Luo X-H, Guo L-J, Yuan L-Q, Xie H, Zhou H-D, Wu X-P et Liao E-Y (2005) Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Experimental Cell Research* **309** 99-109.

Luo X-H, Guo L-J, Xie H, Yuan L-Q, Wu X-P, Zhou H-D et Liao E-Y (2006) Adiponectin Stimulates RANKL and Inhibits OPG Expression in Human Osteoblasts Through the MAPK Signaling Pathway. *Journal of Bone and Mineral Research* **21** 1648-1656.

Lykkjen S, Roed K et Dolvik N (2011) Osteochondrosis and osteochondral fragments in Standardbred trotters: Prevalence and relationships. *Equine Veterinary Journal* **44** 332-338.

Ma Y, Zhu MJ, Zhang L, Hein SM, Nathanielsz PW et Ford SP (2010) Maternal obesity and overnutrition alter fetal growth rate and cotyledonary vascularity and angiogenic factor expression in the ewe. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **299** R249-R258.

Macdonald A, Chavatte P et Fowden A (2000) Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (Equus caballus) in the latter half of gestation. *Placenta* **21** 565-574.

Mackie E, Tatarczuch L et Mirams M (2011) The skeleton: A multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology* **211** 109-121.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N *et al.* (2001) PPARγ Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. *Diabetes* **50**.

Magariños MP, Sánchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC et Varone CL (2007) Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biology of reproduction* **76** 203-210.

Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, Perreau C, Ramé C, Coyral-Castel S et Dupont J (2010) Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **8** 23.

Makki K, Froguel P, Wolowczuk I, Makki K, Froguel P et Wolowczuk I (2013) Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflammation* **2013** 1-12.

Malinowski K, Betros C, Flora L, Kearns C et McKeever K (2002) Effect of training on age-related changes in plasma insulin and glucose. *Equine Veterinary Journal* **34** 147-153.

Malkova N V., Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ et Patterson PH (2012) Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity* **26** 607-616.

Malmström R, Taskinen M-R, Karonen S-L et Yki-JÄrvinen H (1996) Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* **39** 993-996.

Maloyan A, Mele J, Muralimanoharan S et Myatt L (2016) Placental metabolic flexibility is affected by maternal obesity. *Placenta* **45** 69.

Mando C, Calabrese S, Mazzocco MI, Novielli C, Anelli GM, Antonazzo P et Cetin I (2016) Sex specific adaptations in placental biometry of overweight and obese women. *Placenta* **38** 1-7.

Manfredi J, Weber P, Mccutcheon L et Geor R (2014) Evaluation of an arginine stimulation test for assessment of acute insulin response in adult horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **28** 1112-1113.

Maor G, Silbermann M, von der Mark K, Heingard D et Laron Z (1993) Insulin enhances the growth of cartilage in organ and tissue cultures of mouse neonatal mandibular condyle. *Calcified Tissue International* **52** 291-299.

Maor G, Segev Y et Phillip M (1999) Testosterone Stimulates Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor-I-Receptor Gene Expression in the Mandibular Condyle—A Model of Endochondral Ossification. *Endocrinology* **140** 1901-1910.

Maor G, Rochwerger M, Segev Y et Phillip M (2002) Leptin acts as a growth factor on the chondrocytes of skeletal growth centers. *Journal of Bone and Mineral Research* **17** 1034-1043.

Mariella J, Pirrone A, Gentilini F et Castagnetti C (2014) Hematologic and biochemical profiles in Standardbred mares during peripartum. *Theriogenology* **81** 526-534.

Martin B, Reef V, Parente E et Sage A (1996) Causes of poor performance of horses during training, racing, or showing: 348 cases (1992-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **216** 554-558.

Martin L, Geffroy O, Bonneau A, Barré C, Nguyen P et Dumon H (2008) Nutrient intake in high performance show-jumping horses in France. In *Nutrition of the exercising horse*, p 432. Éd M Saastamoinen et W Martin-Rosset. Wageningen Academic Publishers.

Martin A, Yu J, Xiong J, Khalid AB, Katzenellenbogen B, Kim SH, Katzenellenbogen JA, Malaivijitnond S, Gabet Y, Krum SA *et al.* (2017) Estrogens and Androgens Inhibit Association of RANKL with the Pre-osteoblast Membrane through Post-translational Mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*.

Martin-Rosset W (2012) *Nutrition et alimentation des chevaux : Nouvelles recommandations*

alimentaires de l'Inra. Versailles: Éditions Quæ.

Martin-Rosset W et Doreau M (1984) Besoin et alimentation de la jument. In *Le cheval. Reproduction, sélection, alimentation, exploitation*, p 355-370. Éd R Jarrige et W Martin-Rosset. Paris: INRA.

Martin-Rosset W, Doreau M, Boulot S et Miraglia N (1990) Influence of level of feeding and physiological state on diet digestibility in light and heavu breed horses. *Livestock Production Science* **25** 257-264.

Martin-Rosset W, Vermorel M, Doreau M, Tisserand J-L et Andrieu J (1994) The French horse feed evaluation systems and recommended allowances for energy and protein. *Livestock Production Science* **40** 37-56.

Martin-Rosset W, Vernet J, Dubroeucq H, Arnaud G, Picard A et Vermorel M (2008) Variation of fatness and energy content of the body with body condition score in sport horses and its prediction. In *Nutrition of the Exercising Horse*, p 167–176. Éd M Saastamoinen et W Martin-Rosset. Vilnius: Wageningen Academic Publishers.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T *et al.* (1997) Nonadipose tissue production of leptin : Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature* **3** 1029-1033.

De Matteis R, Puxeddu R, Riva A et Cinti S (2002) Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *Journal of Anatomy* **201** 363-370.

McBride S et Mills D (2012) Psychological factors affecting equine performance. *BMC Veterinary Research* **8** 1.

McCance R (1976) Critical periods of growth. In *Proceedings of the Nutrition Society*, p 309.

McCulloch L, van de Bunt M, Braun M, Frayn K, Clark A et Gloyn A (2011) GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. *Molecular Genetics and Metabolism* **104** 648-653.

Meirelles MG, Veras MM, Alonso MA, de Fátima Guimarães C, Nichi M et Fernandes CB (2017) Influence of maternal age and parity on placental structure and foal characteristics from birth up to two years of age. *Journal of Equine Veterinary Science*.

Mendoza L, Lejeune J-P, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Deliège B et Serteyn D (2016) Impact of feeding and housing on the development of osteochondrosis in foals — A longitudinal study.

Preventive Veterinary Medicine **127** 10-14.

Menendez C, Baldelli R, Camiña J, Escudero B, Peino R, Dieguez C et Casanueva F (2003) TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *Journal of Endocrinology* **176** 7-12.

Menzies-Gow N, Stevens K, Barr A, Camm I, Pfeiffer D et Marr C (2010) Severity and outcome of equine pasture-associated laminitis managed in first opinion practice in the UK. *Veterinary Record* **167** 364-369.

Mera P, Laue K, Ferron M, Confavreux C, Wei J, Galan-Diez M, Lacampagne A, Mitchell S, Mattison J, Chen Y *et al.* (2016) Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metabolism* **23** 1078-1092.

Mesa AM, Warren LK, Sheehan JM, Kelley DE et Mortensen CJ (2015) L-Arginine supplementation 0.5% of diet during the last 90 days of gestation and 14 days postpartum reduced uterine fluid accumulation in the broodmare. *Animal Reproduction Science* **159** 46-51.

Meyer H et Ahlswede L (1976) Uber das intrauterine Wachstum und die Körperzusammensetzung von Fohlen sowie den Näkrstoffbedarf tragender Stuten. *Ubers Tierernähng* **4** 263-292.

Miao H, Chen L, Hao L, Zhang X, Chen Y, Ruan Z et Liang H (2015) Stearic acid induces proinflammatory cytokine production partly through activation of lactate-HIF1α pathway in chondrocytes. *Scientific Reports* **5** 13092.

Mîinea C, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peränen J, Lane W et Lienhard G (2005) AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *The Biochemical journal* **391** 87-93.

Milner RDG (1984) Fetal Fat and Glucose Metabolism. In *Fetal Physiology and Medicine*, p 153-175. Éd R Beard et P Nathanielsz. Marcel Dekker, Inc.

Minokoshi Y, Kim Y-B, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D et Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415** 339-343.

Mizokami A, Yasutake Y, Gao J, Matsuda M, Takahashi I, Takeuchi H et Hirata M (2013) Osteocalcin Induces Release of Glucagon-Like Peptide-1 and Thereby Stimulates Insulin Secretion in Mice. *PLoS ONE* **8** 1-8.

Mizokami A, Yasutake Y, Higashi S, Kawakubo-Yasukochi T, Chishaki S, Takahashi I, Takeuchi H et Hirata M (2014) Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating

glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone* **69** 68-79.

Mohrhauser DA, Taylor AR, Underwood KR, Pritchard RH, Wertz-Lutz AE et Blair AD (2015) The influence of maternal energy status during midgestation on beef offspring carcass characteristics and meat quality. *Journal of Animal Science* **93** 786-793.

Montagnani M, Chen H, Barr V et Quon M (2001) Insulin-stimulated Activation of eNOS Is Independent of Ca2+ but Requires Phosphorylation by Akt at Ser1179. *Journal of Biological Chemistry* **276** 30392-30398.

More S (1998) A longitudinal study of Australian racing Thiroughbreds : Performance during the first years of racing. In *RIRDC Epidemiology Workshop for Equine Research Workers*, p 53-70. Éd R Rose et M Offord. Sydney: Rural Industries Research and Development Corporation.

Morel M, Newcombe J et Holland S (2002) Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. *Animal Reproduction Science* **74** 175-185.

Moreno-Aliaga MJ, Stanhope KL et Havel PJ (2001) Transcriptional Regulation of the Leptin Promoter by Insulin-Stimulated Glucose Metabolism in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283** 544-548.

Morgan K (1997) Thermal insulance of peripheral tissue and coat in sport horses. *Journal of Thermal Biology* **22** 169-175.

Morley S et Murray J-A (2014) Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science* **34** 842-853.

Morrison CD, Daniel JA, Holmberg BJ, Djiane J, Raver N, Gertler A et Keisler DH (2001) Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *The Journal of endocrinology* **168** 317-324.

Morrison P, Harris P, Maltin C, Grove-white D, Argo C et Barfoot C (2015) Perceptions of obesity in a UK leisure-based population of horse owners. *Acta Veterinaria Scandinavica* **57** 2015.

Mortensen CJ, Kelley DE et Warren LK (2011) Supplemental l-Arginine Shortens Gestation Length and Increases Mare Uterine Blood Flow before and after Parturition. *Journal of Equine Veterinary Science* **31** 514-520.

Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ et Evans a CO

(2012) Low numbers of ovarian follicles ≥3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of dairy science* **95** 2355-2361.

Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JLH, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ et Evans ACO (2013) Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring 1. *Biology of Reproduction* **88** 92.

Motoshima H, Wu X, Sinha M, Hardy V, Rosato E, Barbot D, Rosato F et Goldstein B (2002) Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: Effects of insulin and rosiglitazone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 5662-5667.

Mottet R, Onan G et Hiney K (2009) Revisiting the Henneke Body Condition Scoring System : 25 Years Later. *Journal of Equine Veterinary Science* **29** 417-418.

Mueckler M et Thorens B (2013) The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* **34** 121-138.

Muhlhausler BS, Adam CL, Findlay PA, Duffield JA et McMillen IC (2006) Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. *The FASEB journal* **20** 1257-1259.

Mumford J et Rossdale P (1980) Virus and its relationship to the « poor performance » syndrome. *Equine Veterinary Journal* **12** 3-9.

Muniyappa R, Montagnani M, Koh K et Quon M (2007) Cardiovascular actions of insulin. *Endocrine Reviews* **28** 463-491.

Murray J-A, Bloxham C, Kulifay J, Stevenson A et Roberts J (2015) Equine Nutrition: A Survey of Perceptions and Practices of Horse Owners Undertaking a Massive Open Online Course in Equine Nutrition. *Journal of Equine Veterinary Science* **35** 510-517.

Myatt L et Maloyan A (2016) Obesity and Placental Function. *Seminars in reproductive medicine* **34** 42-49.

Nadal A, Rovira J, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C et Soria B (1998) Rapid insulinotropic effect of 17ß-estradiol via a plasma membrane receptor. *Faseb Journal* **12** 1341-1348.

Nadal A, Ropero A, Laribi O, Maillet M, Fuentes E et Soria B (2000) Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor

alpha and estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** 11603-11608.

Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL et Jaffe CA (2000) Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology* **141** 3965-3975.

Nagy P, Guillaume D et Daels P (2000) Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science* **60** 245-262.

Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka T, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y *et al.* (2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *The Journal of biological chemistry* **280** 847-851.

Negro Rama S, Valera M, Membrillo A, Gomez M, Solé M, Menendez-Buxadera A, Anaya G et Molina A (2016) Quantitative analysis of short- and long-distance racing performance in young and adult horses and association analysis with functional candidate genes in Spanish Trotter horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **133** 1-10.

Nicholas LM, Rattanatray L, MacLaughlin SM, Ozanne SE, Kleemann DO, Walker SK, Morrison JL, Zhang S, Muhlhäusler BS, Martin-Gronert MS *et al.* (2013) Differential effects of maternal obesity and weight loss in the periconceptional period on the epigenetic regulation of hepatic insulin-signaling pathways in the offspring. *FASEB Journal* **27** 3786-3796.

Van Niekerk C (1965) The early diagnosis of pregnancy, the development of the foetal membranes and nidation in the mare. *Journal of South African Veterinary Medicine Association* **36** 483-488.

Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L et Lorenzo M (2008) Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* **114** 183-194.

Nikel O, Laurencin D, McCallum SA, Gundberg CM et Vashishth D (2013) NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **29** 13873-13882.

Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, Kelly P, Kopchick J, Ormandy C, Ling C *et al.* (2005) Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331** 1120-1126.

Nishizawa H, Shimomura L, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S *et al.* (2002) Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing

adipocyte-derived protein. *Diabetes* **51** 2734-2741.

Noci F, Monahan FJ, French P et Moloney AP (2005) The fatty acid composition of muscle fat and subcutaneous adipose tissue of pasture-fed beef heifers: Influence of the duration of grazing. *Journal of Animal Science* **83** 1167-1178.

Nout Y, Hinchcliff K, Jose-Cunilleras E, Dearth L, Sivko G et DeWille J (2003) Effect of moderate exercise immediately followed by induced hyperglycemia on gene expression and content of the glucose transporter-4 protein in skeletal muscles of horses. *American Journal of Veterinary Research* **64** 1401-1408.

NRC (1978) *Nutrient Requirements of Horses - Fourth revised edition*.

NRC (1989) *Nutrient Requirements of Horses - Fifth revised edition*. Washington, D.C.: National Academies Press.

NRC (2007) *Nutrient Requirements of Horses - Sixth revised edition*. Washington, D.C.: National Academies Press.

Nuttall F, Mooradian A, Gannon M, Billington C et Krezowski P (1984) Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes Care* **7** 465-470.

Oftedal OT, Hintz HF et Schryver HF (1983) Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. *The Journal of nutrition* **113** 2096-2106.

Ogata N, Chizaku D, Kutoba N, Terauchi Y, Tobe K, Azuma Y, Ohta T, Kadowaki T, Nakamura K et Kawaguchi H (2000) Insulin receptor sub- strate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J. Clin. Invest.* **105** 935–943.

Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N *et al.* (2006) Adiponectin Replenishment Ameliorates Obesity-Related Hypertension. *Hypertension* **47** 1108-1116.

Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O et Lindahl A (1992) Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** 9826-9830.

Oikawa M, Yoshihara T, Kaneko M et Yoshikawa T (1990) Morphology of equine allantochorion at the tip of the pregnant horn. *Journal of Comparative Pathology* **103** 343-349.

Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai

R, Noda M *et al.* (2008) Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* **51** 827-835.

Oldham S, Potter G, Evans J, Smith S, Taylor T et Barnes W (1990) Storage and mobilization of muscle glycogen in exercising horses fed a fat-supplemented diet. *Equine Nutrition and Physiology Society* **10** 353-359.

Olson A et Pessin J (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annual Review of Nutrition* **16** 235-256.

Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, Carlson C et Dolvik N (2007) Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *Journal of Orthopaedic Research* **25** 1094-1105.

Olstad K, Ekman S et Carlson C (2015) An Update on the pathogenesis of Osteochondrosis. *Veterinary Pathology* **52** 785-802.

Opsomer GA, A MVE, Kamal MA et A AVS (2017) Epidemiological evidence for metabolic programming in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development* **29** 52-57.

Oriol J, Betteridge K, Hardy J et Sharom F (1993) Structural and developmental relationship between capsular glycoproteins of the horse (Equus caballus) and the donkey (Equus asinus). *Equine Veterinary Journal* **15** 14-18.

Ortega-Senovilla H, Alvino G, Taricco E, Cetin I et Herrera E (2009) Gestational diabetes mellitus upsets the proportion of fatty acids in umbilical arterial but not venous plasma. *Diabetes care* **32** 120-122.

Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladrière L, Moore F, Cunha D, Colli M, Thykjaer T, Thorsen K, Orntoft T *et al.* (2009) The cytokines IL-1 β and TNF- α regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta ... *Diabetes* **59** 358-374.

Osgerby JC, Wathes DC, Howard D et Gadd TS (2004) The effect of maternal undernutrition on the placental growth trajectory and the uterine insulin-like growth factor axis in the pregnant ewe. *Journal of Endocrinology* **182** 89-103.

Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, Yoshikawa H et Shimomura I (2005) Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331** 520-526.

Otani T, Mizokami A, Hayashi Y, Gao J, Mori Y, Nakamura S, Takeuchi H et Hirata M (2015) Signaling

pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cellular Signalling* **27** 532-544.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y et Walsh K (2003a) Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Current opinion in lipidology* **14** 561-566.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K *et al.* (2003b) Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* **107** 671-674.

Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H *et al.* (2003c) Association of Hypoadiponectinemia With Impaired Vasoreactivity. *Hypertension* **42** 231-234.

Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T et Walsh K (2004) Adiponectin Stimulates Angiogenesis by Promoting Cross-talk between AMP-activated Protein Kinase and Akt Signaling in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **279** 1304-1309.

Ouchi N, Parker J, Lugus J et Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11** 85-97.

Oury F (2012) A crosstalk between bone and gonads. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1260** 1-7.

Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P *et al.* (2011) Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* **144** 796-809.

Overgaard R, Henriksen J et Madsen H (2005) Insights to the minimal model of insulin secretion through a mean-field beta cell model. *Journal of Theoretical Biology* **237** 382-389.

Öz OK, Millsaps R, Welch R, Birch J et Zerwekh JE (2001) Expression of aromatase in the human growth plate. *Journal of Molecular Endocrinology* **27** 249-253.

Ozata M, Ozdemir IC et Licinio J (1999) Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84** 3686-3695.

Özen D et Gürcan I (2016) Determination of factors affecting the length of racing career of Arabian horses in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi* **63** 303-309.

Pagan J (1998) The incidence of developmental orthopedic disease (DOD) on a Kentucky Thoroughbred farm. *Advances in Equine Nutrition* 469-475.

Pagan JD, Geor RJ, Caddel SE, Pryor PB et Hoekstra KE (2001) The Relationship Between Glycemic Response and the Incidence of OCD in Thoroughbred Weanlings: A Field Study. In *Proceedings of the 47th AAEP Annual Convention*, p 322-325.

Pagan JD, Koch A, Caddel S et Nash D (2005) Size of Thoroughbred yearlings presented for auction at Keeneland sales affects selling prince. In *19th Equine Science Society Symposium*, p 224-é25.

Painter R, Roseboom T et Bleker O (2005) Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. *Reproductive Toxicology* **20** 345-352.

Painter RC, Osmond C, Gluckman P, Hanson M, Phillips DIW et Roseboom TJ (2008a) Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **115** 1243-1249.

Painter RC, Westendorp RGJ, De Rooij SR, Osmond C, Barker DJP et Roseboom TJ (2008b) Increased reproductive success of women after prenatal undernutrition. *Human Reproduction* **23** 2591-2595.

Palmer E et Guillaume D (1992) Photoperiodism in the equine species - what is a long night? *Animal Reproduction Science* **28** 21-30.

Panchenko PE, Voisin S, Jouin M, Jouneau L, Prézelin A, Lecoutre S, Breton C, Jammes H, Junien C et Gabory A (2016) Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth in mice. *Clinical Epigenetics* **8** 22.

Paneni F, Costantino S et Cosentino F (2014) Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk. *Current Atherosclerosis Reports* **16** 642-653.

Parameswaran N et Patial S (2010) Tumor necrosis factor-α signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **20** 87-103.

Park H-K et Ahima R (2015) Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism* **64** 24-34.

Parr BYRA, Williams AH, Campbell IP, Witcombe GF et Robertst AM (1986) Low nutrition of ewes in early pregnancy and the residual effect on the offspring. *Journal of Agricultural Science* **106** 81-87.

Parthasarathy L, Khadilkar V, Chiplonkar S, Zulf Mughal M et Khadilkar A (2016) Bone status of Indian

children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Bone* **82** 16-20.

Patrick LA et Smith GN (2002) Proinflammatory cytokines: A link between chorioamnionitis and fetal brain injury. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada* **24** 705-709.

Patzelt C, Labrecque D, Duguid J, Carroll R, Keim P, Heinrikson R et Steiner D (1978) Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75** 1260-1264.

Pazinato FM, Curcio R, Fernandes CG, Antonio S, Santos CA et Feij LS (2017) Histomorphometry of the placental vasculature and microcotyledons in Thoroughbred mares with chronic laminitis. *Theriogenology* **91** 77-81.

Peake J, Della Gatta P, Suzuki K et Nieman D (2015) Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise Immunology Review* **21** 8-25.

Peansukmanee S, Vaughan-Thomas A, Carter S, Clegg P, Taylor S, Redmond C et Mobasheri A (2009) Effects of hypoxia on glucose transport in primary equine chondrocytes in vitro and evidence of reduced GLUT1 gene expression in pathologic cartilage in vivo. *Journal of Orthopaedic Research* **27** 529-535.

Pearce SG, Firth EC, Grace ND et Fennessy PF (1998a) Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. *Equine veterinary journal* **30** 211-218.

Pearce SG, Grace ND, Wichtel JJ, Firth EC et Fennessy PF (1998b) Effect of copper supplementation on copper status of pregnant mares and foals. *Equine veterinary journal* **30** 200-203.

Pearson L (2015) Adiponectin in equine reproduction. Washington State University.

Pepys MB, Baltz ML, Tennent GA, KENT Peter JE, Ousey J et Rossdale PD (1989) Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *EQUINE VETERINARY JOURNAL Equine vcr. J* **21** 106-109.

Pérez-Pérez A, Maymó J, Dueñas JL, Goberna R, Calvo JC, Varone C et Sánchez-Margalet V (2008) Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **477** 390-395.

Perkins GA et Wagner B (2015) The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Veterinary Journal* **47** 267-274.

Perry G (2016) *2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*.

Perry HM, Miller DK, Patrick P et Morley JE (2000) Testosterone and leptin in older African-American men: Relationship to age, strength, function, and season. *Metabolism* **49** 1085-1091.

Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, Dahirel M, Dubois C, Jouneau L, Reigner F *et al.* (2014) Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Pre-Weaning Horses. *PLoS ONE* **9** e102044.

Peugnet P, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, Guillaume D, Camous S, Berthelot V, Toquet M-P *et al.* (2015) Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre- weaning horses. *PLoS ONE* **10** e0122596.

Peugnet P, Robles M, Wimel L, Tarrade A et Chavatte-Palmer P (2016a) Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. *Theriogenology* **86** 99-109.

Peugnet P, Mendoza L, Wimel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, Caudron I, Deliège B, Toquet M-P, Richard E *et al.* (2016b) Longitudinal Study of Growth and Osteoarticular Status in Foals Born to Between-Breed Embryo Transfers. *Journal of Equine Veterinary Science* **37** 24-38.

Philbrick J, Wong C, Branscum A, Turner R et Iwaniec U (2017) Leptin Stimulates Bone Formation in ob/ob Mice at Doses Having Minimal Impact on Energy Metabolism. *Journal of Endocrinology* **232** 461-474.

Phillips T, Ferraz I, Bell S, Clegg P, Carter S et Mobasheri A (2005) Differential regulation of the GLUT1 and GLUT3 glucose transporters by growth factors and pro-inflammatory cytokines in equine articular chondrocytes. *Veterinary Journal* **169** 216-222.

Philp LK, Muhlhausler BS, Janovska A, Wittert GA, Duffield JA et McMillen IC (2008) Maternal overnutrition suppresses the phosphorylation of 5'-AMP activated protein kinase (AMPK) in liver, but not skeletal muscle, in fetal and neonatal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295** 1982-1990.

Phornphutkul C, Wu K et Gruppuso P (2006) The role of insulin in chondrogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **249** 107-115.

Physick-Sheard P (1986) Career profile of the Canadian Standardbred. II. Influence of age, gait and sex upon number of races, money won and race times. *Canadian Journal of Veterinary Research* **50** 457-470.

Pi M, Zhang L, Lei S-F, Huang M-Z, Zhu W, Zhang J, Shen H, Deng H-W et Quarles LD (2010) Impaired osteoblast function in GPRC6A null mice. *Journal of bone and mineral research* **25** 1092-1102.

Pi M, Wu Y et Quarles L (2011) GPRC6A mediates responses to osteocalcin in b-cells in vitro and pancreas in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* **26** 1680-1683.

Pieramati C, Pepe M, Silvestrelli M et Bolla A (2003) Heritability estimation of osteochondrosis dissecans in Maremmano horses. *Livestock Production Science* **79** 249-255.

Pieszka M et Luszczynski J (2013) Main composition and macroelements content in mare milk during first month after parturition and occurrence of « heat diarrhoea » in their foals. *Nauka Przyroda Technologie* **7** 8.

Pietro L, Daher S, Rudge MVC, Calderon IMP, Damasceno DC, Sinzato YK, Bandeira C et Bevilacqua E (2010) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta* **31** 770-780.

Pikul J, Wojtowski J, Dankow R, Kuczynska B et Lojek J (2008) Fat content and fatty acids profile of colostrum and milk of primitive Konik horses (Equus caballus gmelini Ant.) during six months of lactation. *The Journal of dairy research* **75** 302-309.

Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D et Core Team R (2017) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. *R package version 2.1-131*.

Pirrone F, Albertini M, Clement M et Lafortuna C (2007) Respiratory mechanics in Standardbred horses with sub-clinical inflammatory airway disease and poor athletic performance. *Veterinary Journal* **173** 146-152.

Platt H (1978) Growth and maturity in the equine fetus'. *Journal of the Royal Society of Medicine* **71**.

Pleasant R, Suagee J, Thatcher C, Elvinger F et Geor R (2013) Adiposity, plasma insulin, leptin, lipids, and oxidative stress in mature light breed horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **27** 576-582.

Poitout V, Rouault C, Guerre-Millo M, Briaud I et Reach G (1998) Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of Langerhans. *Endocrinology* **139** 822-826.

Pollock N (2015) Childhood obesity, bone development, and cardiometabolic risk factors. *Molecular and cellular endocrinology* **410** 52-63.

Pool-Anderson L, Raub R et Warren J (1994) Maternal Influences on Growth and Development of Full-

Sibling Foals. *Journal of Animal Science* **72** 1661-1666.

Portrait F, Teeuwiszen E et Deeg D (2011) Early life undernutrition and chronic diseases at older ages: The effects of the Dutch famine on cardiovascular diseases and diabetes. *Social Science and Medicine* **73** 711-718.

Posta J, Rudiné Mezei A, Mihók S et Mészáros G (2014) Evaluation of the length of competitive life in Hungarian sport horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **131** 529-535.

Potenza M, Marasciulo F, Chieppa D, Brigiani G, Formoso G, Quon M et Montagnani M (2005) Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289** H813-22.

Potenza M, Marasciulo F, Tarquinio M, Quon M et Montagnani M (2006) Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. *Diabetes* **55** 3594-3603.

Potter S, Bamford N, Harris P et Bailey S (2016) Prevalence of obesity and owners' perceptions of body condition in pleasure horses and ponies in south-eastern Australia. *Australian Veterinary Journal* **94** 427-432.

Poundarik AA, Diab T, Sroga GE, Ural A, Boskey AL, Gundberg CM et Vashishth D (2012) Dilatational band formation in bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109** 19178-19183.

Powell D, Reedy S, Sessions D et Fitzgerald B (2002) Effect of short-term exercise training on insulin sensitivity in obese and lean mares. *Equine Veterinary Journal* **34** 81-84.

Pramojanee S, Phimphilai M, Kumphune S, Chattipakorn N et Chattipakorn S (2013) Decreased Jaw Bone Density and Osteoblastic Insulin Signaling in a Model of Obesity. *Journal of Dental Research* **92** 560-565.

Pramojanee S, Phimphilai M, Chattipakorn N et Chattipakorn S (2014) Possible roles of insulin signaling in osteoblasts. *Endocrine research* **39** 144-151.

Pratt S, Geor R et McCutcheon L (2005) Repeatability of 2 methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. *Journal of veterinary internal medicine* **19** 883-888.

Pratt-Phillips S, Owens K, Dowler L et Cloninger M (2010) Assessment of Resting Insulin and Leptin Concentrations and Their Association With Managerial and Innate Factors in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **30** 127-133.

Prezotto LD, Camacho LE, Lemley CO, Keomanivong FE, Caton JS, Vonnahme KA et Swanson KC (2016) Nutrient restriction and realimentation in beef cows during early and mid-gestation and maternal and fetal hepatic and small intestinal in vitro oxygen consumption. *Animal* 1-9.

Prince CS, Maloyan A et Myatt L (2017) Tropomyosin Receptor Kinase B Agonist, 7,8-Dihydroxyflavone, Improves Mitochondrial Respiration in Placentas From Obese Women. *Reproductive Sciences* **In Press** 1-11.

Pritchard JJ (1952) A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J Anat.* **86** 259-277.

Pukel C, Baquerizo H et Rabinovitch A (1988) Destruction of Rat Islet Cell Monolayers by Cytokines: Synergistic Interactions of Interferon-γ, Tumor Necrosis Factor, Lymphotoxin, and Interleukin 1. *Diabetes* **37**.

Pun K, Lau P et Ho P (1989) The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. *Journal of Bone and Mineral Research* **4** 853-862.

Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH et Tamashiro KLK (2011) Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiology & Behavior* **104** 474-479.

Purohit A, Flanagan AM et Reed MJ (1992) Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology* **131** 2027-2029.

Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE et Ahima RS (2004) Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nature Medicine* **10** 524-529.

Qian H, Barb C, Compton M, Hausman G, Azain M, Kraeling R et Baile C (1999) Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* **16** 135-143.

Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P et Hauguel-de Mouzon S (2003) Gestational Diabetes Induces Placental Genes for Chronic Stress and Inflammatory Pathways. *Diabetes* **52**.

Rae MT, Kyle CE, Miller DW, Hammond AJ, Brooks AN et Rhind SM (2002) The effects of

undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Animal Reproduction Science* **72** 63-71.

Raggatt LJ et Partridge NC (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry* **285** 25103-25108.

Ralston S (1996) Postprandial hyperglycemica/hyperinsulinemia in young horses with osteochondritis dissecans lesions. *Pferdeheilkunde* 320-322.

Raught B, Gingras A et Sonenberg N (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** 7037-7044.

Reddy S, Lau EM et Ross JM (2003) Immunohistochemical Demonstration of Leptin in Pancreatic Islets of Non-Obese Diabetic and CD-1 mice: Co-localization in Glucagon Cells and its Attenuation at the Onset of Diabetes. *Journal of Molecular Histology* **35** 511-519.

Redmer DA, Wallace JM et Reynolds LP (2004) Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domestic Animal Endocrinology* **27** 199-217.

Redmer DA, Aitken RP, Milne JS, Reynolds LP et Wallace JM (2005) Influence of maternal nutrition on messenger RNA expression of placental angiogenic factors and their receptors at midgestation in adolescent sheep. *Biology of Reproduction* **72** 1004-1009.

Reed SA, Raja JS, Hoffman ML, Zinn S a et Govoni KE (2014) Poor maternal nutrition inhibits muscle development in ovine offspring. *Journal of animal science and biotechnology* **5** 43.

REFErences (2011) *Le marché de cheval de sport-loisir en 2010*.

REFErences (2016a) *Chiffres clés 2016*.

REFErences (2016b) *Annuaire écus*.

Regensteiner JG, Bauer TA, Huebschmann AG, Herlache L, Weinberger HD, Wolfel EE et Reusch JEB (2015) Sex differences in the effects of type 2 diabetes on exercise performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **47** 58-65.

Reinehr T et Roth CL (2010) A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *International Journal of Obesity* **34** 852-858.

Reitman ML, Bi S, Marcus-Samuels B et Gavrilova O (2001) Leptin and its role in pregnancy and fetal

development--an overview. *Biochemical Society transactions* **29** 68-72.

Rejnö S et Strömberg B (1978) Osteochondrosis in the horse. II. Pathology. *Acta radiologica. Supplementum* **358** 153-178.

Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner Ø, Gordeladze JO et Drevon CA (2001) Leptin Is Expressed in and Secreted from Primary Cultures of Human Osteoblasts and Promotes Bone Mineralization. *Journal of Bone and Mineral Research* **16** 1426-1433.

Reusch JEB, Bridenstine M et Regensteiner JG (2013) Type 2 diabetes mellitus and exercise impairment. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **14** 77-86.

Rey C, Combes C, Drouet1 C et Glimcher M (2010) Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis international* **20** 1013-1021.

Ribon V et Saltiel A (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *The Biochemical journal* **846** 839-845.

Ribon V, Herrera R, Kay B et Saltiel A (1998) A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain- containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *Journal of Biological Chemistry* **273** 4073-4080.

Ricard A (2004) Heritability of jumping ability and height of pony breeds in France. *Livestock Production Science* **89** 243-251.

Ricard A et Blouin C (2011) Genetic analysis of the longevity of French sport horses in jumping competition. *Journal of Animal Science* **89** 2988-2994.

Richards N et Kempton T (2016) The post feeding glycaemic and insulin response to copra meal in horses. *Animal Feed Science and Technology* **211** 100-108.

Richards N, Hinch G et Rowe J (2006) The effect of current grain feeding practices on hindgut starch fermentation and acidosis in the Australian racing Thoroughbred. *Australian Veterinary Journal* **84** 402-407.

Richardson D (2011) Diagnosis and Management of Osteochondrosis and Osseous Cystlike Lesions. In *Diagnosis and management of lameness in the horse*, Second edi, p 631-638. Éd M Ross et S Dyson. Saunders, Elsevier.

Riddle RC et Clemens TL (2017) Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis. *Physiological Reviews* **97** 667-698.

Riddle RC, Frey JL, Tomlinson RE, Ferron M, Li Y, DiGirolamo DJ, Faugere M-C, Hussain MA, Karsenty G et Clemens TL (2014) Tsc2 Is a Molecular Checkpoint Controlling Osteoblast Development and Glucose Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology* **34** 1850-1862.

Riley C, Scott W, Caron J, Fretz P, Bailey J et Barber S (1998) Osteochondritis dessicans and subchondral cystic lesions in draft horses: A retrospective study. *Canadian Veterinary Journal* **39** 627-633.

Robert C, J-P V et Denoix J-M (2006) Correlation between routine radiographic findings and early racing career in French Trotters. *Equine Veterinary Journal* **36** 473-478.

Roberts J et Murray J-A (2014) Equine Nutrition in the United States: A Review of Perceptions and Practices of Horse Owners and Veterinarians. *Journal of Equine Veterinary Science* **34** 854-859.

Roberts KA, Riley SC, Reynolds RM, Barr S, Evans M, Statham A, Hor K, Jabbour HN, Norman JE et Denison FC (2011) Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta* **32** 247-254.

Robin C, Ireland J, Wylie C, Collins S, Verheyen K et Newton J (2015) Prevalence of and risk factors for equine obesity in Great Britain based on owner-reported body condition scores. *Equine Veterinary Journal* **47** 196-201.

Rodrigues MN, Carvalho RC, Franciolli ALR, Rodrigues RF, Rigoglio NN, Jacob JCF, Gastal EL et Miglino MA (2014) Prenatal development of the digestive system in the horse. *Anatomical Record* **297** 1218-1227.

Rodriguez A (2010) Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* **51** 134-143.

Rodriguez A, Miettunen J, Henriksen TB, Olsen J, Obel C, Taanila A, Ebeling H, Linnet KM, Moilanen I et Jarvelin MR (2008) Maternal adiposity prior to pregnancy is associated with ADHD symptoms in offspring: evidence from three prospective pregnancy cohorts. *Internal Journal of Obesity* **32** 550-557.

Rodríguez-González GL, Vega CC, Boeck L, Vázquez M, Bautista CJ, Reyes-Castro LA, Saldaña O, Lovera D, Nathanielsz PW et Zambrano E (2015) Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *International journal of obesity (2005)* **39** 549-556.

Roman E, Reis D, Romanatto T, Maimoni D, Ferreira E, Santos G, Torsoni A, Velloso L et Torsoni M

(2010) Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1?? activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology* **314** 62-69.

Ropero A, Soria B et Nadal A (2002) A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Molecular Endocrinology* **16** 497-505.

Rorsman P et Braun M (2013) Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual review of physiology* **75** 155-179.

Roseboom TJ, Van Der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Ravelli ACJ et Bleker OP (2001a) Adult survival after prenatal exposure to the Dutch famine 1944-45. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* **15** 220-225.

Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Ravelli ACJ, Osmond C, Barker DJP et Bleker OP (2001b) Effects of prenatal expossure to the Ductch famine on adult disease in later life: an overview. *Molecular and Cellular Endocrinology* **185** 93-98.

Roseboom T, de Rooij S et Painter R (2006) The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Human Development* **82** 485-491.

Rosen ED (2016) Epigenomic and transcriptional control of insulin resistance. *Journal of Internal Medicine* **280** 443-456.

Rotta PP, Filho SCV, Gionbelli TRS, Silva LFC, Engle TE et Marcondes MI (2015) Effects of day of gestation and feeding regimen in Holstein × Gyr cows : III . Placental adaptations and placentome gene expression. *Journal of Dairy Science* **98** 3224-3235.

Rotter V, Nagaev I et Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor-α, Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. *Journal of Biological Chemistry* **278** 45777-45784.

Ruan H et Lodish HF (2003) Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine & growth factor reviews* **14** 447-455.

Ruan H, Miles PDG, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM et Lodish HF (2002) Profiling Gene Transcription In Vivo Reveals Adipose Tissue as an Immediate Target of Tumor Necrosis Factor-α. *Diabetes* **51**.

Saben J, Zhong Y, Gomez-Acevedo H, Thakali KM, Borengasser SJ, Andres A et Shankar K (2013) Early growth response protein-1 mediates lipotoxicity-associated placental inflammation: role in

maternal obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **305** E1-14.

Saben J, Lindsey F, Zhong Y, Thakali K, Badger TM, Andres A, Gomez-Acevedo H et Shankar K (2014) Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta* **35** 171-177.

Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H *et al.* (2002) Role of leptin in pregnancy - A review. *Placenta* **23** S80-S86.

Saito K, Tobe T, Yoda M, Nakano Y, Choi-Miura NH et Tomita M (1999) Regulation of gelatin-binding protein 28 (GBP28) gene expression by C/EBP. *Biological & pharmaceutical bulletin* **22** 1158-1162.

Sakai T (1955) Studies on the development of the embryonic ovary in swine, cattle and horse. *Japanese Journal of Veterinary Research* **3** 183-198.

Saltiel A et Kahn C (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414** 799-806.

Samuel A, Allen W et Steven D (1974) Studies on the equine placenta. I. Development of the microcotyledons. *Journal of Reproduction and Fertility* **41** 441-445.

Samuel C a, Allen WR et Steven DH (1976) Studies on the equine placenta II. Ultrastructure of the placental barrier. *Journal of reproduction and fertility* **48** 257-264.

Sanchez A, Candau R et Bernardi H (2014) FoxO transcription factors: Their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71** 1657-1671.

Sanchez M, Azor P, Molina A, Parkin T, Rivero J et Valera M (2016) Prevalence, risk factors and genetic parameters of cresty neck in Pura Raza Español horses. *Equine Veterinary Journal* **49** 196-200.

Sandgren B, Dalin G et Carlstenf J (1993) Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters. I. Epidemiology. *Equine Veterinary Journal* **16** 31-37.

Santos E, De Almeida F, Vieira A, Pinto L, Corassa A, Pimentel R, Silva V et Galzerano L (2005) Lactação em éguas da raça Mangalarga Marchador: Produção e composição do leite e ganho de peso dos potros lactentes. *Revista Brasileira de Zootecnia* **34** 627-634.

Santos S, Oliveira A et Lopes C (2013) Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines. *Nutrition Research* **33** 687-695.

Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y *et*

al. (2007) Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nature Medicine* **13** 1234-1240.

Sattar N, Greer IA, Louden J, Lindsay G, McConnell M, Shepherd J et Packard CJ (1997) Lipoprotein Subfraction Changes in Normal Pregnancy: Threshold Effect of Plasma Triglyceride on Appearance of Small, Dense Low Density Lipoprotein. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82** 2483-2491.

Satué K et Montesinos P (2013) Plasma biochemistry in pregnant Spanish purebred broodmares. *Comparative Clinical Pathology* **22** 113-117.

Satué K, Muñ Oz A et Blanco O (2010) Pregnancy influences the hematological profile of carthusian broodmares. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **13** 393-394.

Satué K, Felipe M, Mota J et Muñoz A (2011a) Factors influencing gestational length in mares: A review. *Livestock Science* **136** 287-294.

Satué K, Felipe M, Mota J et Muñoz A (2011b) Gestational length in Carthusian broodmares: effects of breeding season, foal gender, age of mare, year of parturition, parity and sire. *Polish journal of veterinary sciences* **14** 173-180.

Savage CJ, McCarthy RN et Jeffcott LB (1993a) Effects of dietary phosphorus and calcium on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine Veterinary Journal* **16** 74-79.

Savage C, McCarthy R et Jeffcott L (1993b) Effects of dietary energy and protein induction on dyschondroplasia in foals. *Equine veterinary journal. Supplement* **16** 74-79.

Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez M et Somchit A (2006) A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development* **46** 339-354.

Schlechter NL, Russell SM, Spencer EM et Nicoll CS (1986) Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83** 7932-7934.

Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R et Fischer B (2008) Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochemistry and Cell Biology* **129** 817-825.

Schuver A, Frank N, Chameroy K et Elliott S (2014) Assessment of insulin and glucose dynamics by using an oral sugar test in horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **34** 465-470.

Scott B, Potter G, Greene L, Hargis P et Anderson G (1992) Efficacy of a fat-supplemented diet on muscle glycogen concentrations in exercising thoroughbred horses maintained in varying body conditions. *Equine Nutrition and Physiology Society* **12** 109-113.

Seierø T, Mark T et Jönsson L (2016) Genetic parameters for longevity and informative value of early indicator traits in Danish show jumping horses. *Livestock Science* **184** 126-133.

Selim S, Elo K, Jaakkola S, Karikoski N, Boston R, Reilas T, Särkijärvi S, Saastamoinen M et Kokkonen T (2015) Relationships among body condition, insulin resistance and subcutaneous adipose tissue gene expression during the grazing season in mares. *PLoS ONE* **10** e0125968.

Sen U, Sirin E, Ensoy U, Aksoy Y, Ulutas Z et Kuran M (2016) The effect of maternal nutrition level during mid-gestation on postnatal muscle fibre composition and meat quality in lambs. *Animal Production Science* **56** 834-843.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA et Mooney RA (2002) Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* **51** 3391-3399.

Serrano-Recalde EC, Queiroz-Silva JC, Guimarães C de F, Veras MM, Barbosa RG, Alonso MA, Fernandes CB, Serrano-Recalde EC, Queiroz-Silva JC, Guimarães C de F *et al.* (2017) Pluriparity in mares: Relationship with maternal, placental and neonatal characteristics. *Ciência Animal Brasileira* **18** 1-11.

Serteyn D, Piquemal D, Vanderheyden L, Lejeune JP, Verwilghen D et Sandersen C (2010) Gene expression profiling from leukocytes of horses affected by osteochondrosis. *Journal of Orthopaedic Research* **28** 965-970.

Sessions-Bresnahan DR et Carnevale EM (2014) The effect of equine metabolic syndrome on the ovarian follicular environment. *Journal of Animal Science* **92** 1484-1493.

Sharp DC (1980) Environmental influences on reproduction in horses. *Veterinary Clinics of North America* **2** 207-223.

Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S et Okita K (2005) Leptin enhances TNF-α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sciences* **77** 1502-1515.

Sherman K, Miller G, Wronski T, Colahan T, Brown M et Wilson W (1995) The effect of training on

equine metacarpal bone breaking strength. *Equine Veterinary Journal* **27** 135-139.

Shi YC et Baldock PA (2012) Central and peripheral mechanisms of the NPY system in the regulation of bone and adipose tissue. *Bone* **50** 430-436.

Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N et Mori M (1997) Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *Journal of Endocrinology* **154** 285-292.

Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W *et al.* (2004) Impairment of Bone Healing by Insulin Receptor Substrate-1 Deficiency. *Journal of Biological Chemistry* **279** 15314-15322.

Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, Terauchi Y, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S *et al.* (2006) Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *Journal of Cellular Biochemistry* **99** 196-208.

Da Silva P, Aitken R, Rhind S, Racey P et Wallace J (2001) Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction* **122** 375-383.

Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA et Wallace JM (2003) Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. *Placenta* **24** 248-257.

Silver M, Fowden A, Taylor P, Knox J et Hill C (1994) Blood amino acids in the pregnant mare and fetus: the effects of maternal fasting and intrafetal insulin. *Experimental Physiology* **79** 423-433.

Sims NA, Clément-Lacroix P, Da Ponte F, Bouali Y, Binart N, Moriggl R, Goffin V, Coschigano K, Gaillard-Kelly M, Kopchick J *et al.* (2000) Bone homeostasis in growth hormone receptor-null mice is restored by IGF-I but independent of Stat5. *The Journal of clinical investigation* **106** 1095-1103.

Sjöholm K, Palming J, Olofsson LE, Gummesson A, Svensson PA, Lystig TC, Jennische E, Brandberg J, Torgerson JS, Carlsson B *et al.* (2005) A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: Adipose tissue as a major production site of serum amyloid A. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 2233-2239.

Skaggs DL, Loro ML, Pitukcheewanont P, Tolo V et Gilsanz V (2001) Increased Body Weight and Decreased Radial Cross-Sectional Dimensions in Girls with Forearm Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research* **16** 1337-1342.

Sliwowska J, Fergani C, Gawałek M, Skowronska B, Fichna P et Lehman M (2014) Insulin: Its role in the central control of reproduction. *Physiology & behavior* **133** 197-206.

Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M (1999) Laminitis in the horse: a review. *The Veterinary quarterly* **21** 121-127.

Smith A, Staniar W et Splan R (2006) Associations between yearling body measurements and career racing performance in Thoroughbred racehorses. *Journal of Equine Veterinary Science* **26** 212-214.

Smith S, Marr CM, Dunnett C et Menzies-Gow NJ (2016) The effect of obesity and endocrine function on foal birthweight in Thoroughbred mares. *Equine Veterinary Journal*.

Snodgrass RG, Huang S, Namgaladze D, Jandeli O, Shao T, Sama S, Brüne B et Hwang DH (2016) Docosahexaenoic acid and palmitic acid reciprocally modulate monocyte activation in part through endoplasmic reticulum stress. *Journal of Nutritional Biochemistry* **32** 39-45.

Sobczyńska M (2007) The effect of selected factors on length of racing career in Thoroughbred racehorses in Poland. *Animal Science Papers and Reports* **25** 131-141.

Sommaire L (2007) Pratiques alimentaires et entrainement du cheval de course de 3 ans : enquête dans 60 écuries en France - Etude des apports azotés et énergétiques. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

Southwood L, Evans D, Bryden W et Rose R (1993a) Nutrient intake of horses in Thoroughbred and Standardbred stables. *Australian Veterinary Journal* **70** 164-168.

Southwood L, Evans D, Bryden W et Rose R (1993b) Feeding practices in Thoroughbred and Standardbred racehorse stables. *Australian Veterinary Journal* **70** 184-185.

Souza CO, Teixeira AA, Biondo LA, Silveira LS, Calder PC et Rosa Neto JC (2017) Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NFκB, independently of PPARs. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **44** 566-575.

Stachowiak EK, Oommen S, Vasu VT, Srinivasan M, Stachowiak M, Gohil K et Patel MS (2013) Maternal obesity affects gene expression and cellular development in fetal brains. *Nutritional neuroscience* **16** 96-103.

Staiger H, Tschritter O, Machann J, Thamer C, Fritsche A, Maerker E, Schick F, Häring H-U et Stumvoll M (2003) Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution

in humans. *Obesity research* **11** 368-372.

Stammers J, Silver M et Fowden A (1988) Effects of nutrition on uterine and umbilical venous plasma lipids in chronically catheterised mares in late gestation. *Equine Veterinary Journal* **20** 37-40.

Stammers JP, Hull D, Silver M, Fowden AL, Ousey J et Rossdale PD (1994) Release of lipid from the equine placenta during in vitro incubation. *Placenta* **15** 857-872.

Stephens JM, Butts MD et Pekala PH (1992) Regulation of transcription factor mRNA accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation by tumour necrosis factor-alpha. *Journal of molecular endocrinology* **9** 61-72.

Stephenson H, Green M et Freeman S (2011) Prevalence of obesity in a population of horses in the UK. *Veterinary Record* **168** 1.

Steven D (1982) Placentation in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* **31** 41-55.

Steven D et Samuel C (1975) Anatomy of the placental barrier in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* **23** 579-582.

Stewart FM, Freeman DJ, Ramsay JE, Greer IA, Caslake M et Ferrell WR (2007) Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placental function throughout pregnancy in lean and obese mothers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92** 969-975.

Steyn C, Hawkins P, Saito T, Noakes DE, Kingdom JCP et Hanson MA (2001) Undernutrition during the first half of gestation increases the predominance of fetal tissue in late-gestation ovine placentomes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **98** 165-170.

Sticker L, Thompson D et Gentry L (2001) Pituitary hormone and insulin responses to infusion of amino acids and N -methyl- D, L -aspartate in horses 1. *Journal of Animal Science* **79** 735-744.

Stitt T, Drujan D, Clarke B, Panaro F, Timofeyva Y, Kline W, Gonzalez M, Yancopoulos G et Glass D (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell* **14** 395-403.

Storer W, Thompson D, Waller C et Cartmill J (2007) Hormonal patterns in normal and hyperleptinemic mares in response to three common feeding-housing regimens. *Journal of Animal Science* **85** 2873-2881.

Stout TAE (2016) Embryo-maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy.

Theriogenology **86** 349-354.

Stout TAE et Allen WR (2002) Prostaglandin E2 and F2a production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction* **123** 261-268.

Stout T, Gibson C, de Ruijter Villani M, Gibson C et Stout T (2015) Effect of asynchronous embryo transfer on glucose transporter expression in equine endometrium. *Animal Reproduction* **12** 790.

Strand E, Braathen L, Hellsten M, Huse-olsen L et Bjornsdottir S (2007) Radiographic closure time of appendicular growth plates in the Icelandic horse. *Acta Veterinaria Scandinavica* **49** 19.

Streeter AJ, Hosking J, Metcalf BS, Jeffery AN, Voss LD et Wilkin TJ (2013) Body fat in children does not adversely influence bone development: a 7-year longitudinal study (EarlyBird 18). *Pediatric Obesity* **8** 418-427.

Stromberg B (1979) A review of the salient features of osteochondrosis in the horse. *Equine veterinary journal* **11** 211-214.

Stuart C, Wen G, Williamson M, Jiang J, Gilkison C, Blackwell S, Nagamani M et Ferrando A (2001) Altered GLUT1 and GLUT3 gene expression and subcellular redistribution of GLUT4: Protein in muscle from patients with acanthosis nigricans and severe insulin resistance. *Metabolism* **50** 771-777.

Stuart C, Howell M, Zhang Y et Yin D (2009) Insulin-Stimulated Translocation of Glucose Transporter (GLUT) 12 Parallels That of GLUT4 in Normal Muscle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94** 3535-3542.

Suagee J, Burk A, Quinn R, Petersen E, Hartsock T et Douglass L (2008) Effects of Diet and Weight Gain on Body Condition Scoring in Thoroughbred Geldings. *Journal of Equine Veterinary Science* **28** 156-166.

Suagee J, Corl B, Hulver M, McCutcheon L et Geor R (2011) Effects of hyperinsulinemia on glucose and lipid transporter expression in insulin-sensitive horses. *Domestic Animal Endocrinology* **40** 173-181.

Suagee J, Corl B, Crisman M, Pleasant R, Thatcher C et Geor R (2013) Relationships between Body Condition Score and Plasma Inflammatory Cytokines, Insulin, and Lipids in a Mixed Population of Light-Breed Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **27** 157-163.

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES *et al.* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 15545-15550.

Sullivan EL, Grayson B, Takahashi D, Robertson N, Maier A, Bethea CL, Smith MS, Coleman K et Grove KL (2010) Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *Journal of Neurosiences* **30** 3826-3830.

Superchi P, Vecchi I, Beretti V et Sabbioni A (2014) Relationship among BCS and Fat Thickness in Horses of Different Breed , Gender and Age. *Annual research & Review in Biology* **4** 354-365.

Sutton E, Bowland J et Ratcliff W (1977) Influence of level of energy and nutrient intake by Mares on Reproductive Performance and on Blood Serum Composition of the Mares and Foals. *Canadian journal of animal science* **57** 551-558.

Suyama S, Maekawa F, Maejima Y, Kubota N, Kadowaki T et Yada T (2016) Glucose level determines excitatory or inhibitory effects of adiponectin on arcuate POMC neuron activity and feeding. *Scientific reports* **6** 30796.

Suzana M, Vedrana P, Zvonko S, Maja Z et Jasna P (1994) Concentrations of total proteins and albumins, and AST, ALT and GGT activities in the blood plasma of mares during pregnancy and early lactation. *Veterinarski Arhiv* **75** 195-202.

Swanson TJ, Hammer CJ, Luther JS, Carlson DB, Taylor JB, Redmer DA, Neville TL, Reed JJ, Reynolds LP, Caton JS *et al.* (2008) Effects of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. *Journal of Animal Science* **86** 2415-2423.

Szarska E, Cywinska A, Ostaszewski P et Kowalska A (2014) Effectiveness of training programmes used in two stables of thoroughbred race horses. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **17** 681-685.

Tabandeh MR, Hosseini A, Saeb M, Kafi M et Saeb S (2010) Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different stages of development. *Theriogenology* **73** 659-669.

Taichman RS et Hauschka P V (1992) Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on osteoblastic expression of osteocalcin and mineralized extracellular matrix invitro. *Inflammation*

16 587-601.

Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S et Kobayashi Y (2011) Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **16** 21-30.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P et Karsenty G (2002) Leptin Regulates Bone Formation via the Sympathetic Nervous System. *Cell* **111** 305-317.

Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K *et al.* (2006) Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* **147** 3203-3210.

Talluri T, Arangasamy A, Singh J, Ravi S, Pal Y, Legha R, Alpha Raj M, Chopra A, Singh R et Tripathi B (2016) Factors affecting length of gestation in artificially inseminated Marwari mares of India. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **5** 481-489.

Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB et Fang MZ (2013) The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Maternal and Child Health Journal* **17** 222-229.

Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J *et al.* (2009) TGF-β1–induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature Medicine* **15** 757-765.

Tannenbaum GS, Gurd W et Lapointe M (1998) Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone. *Endocrinology* **139** 3871-3875.

Taylor N, Manjarin R, Woodward A, Holcombe S et Trottier N (2012) Transcript Profiles of Hexose Transporters in the Equine Gastrointestinal Tract. *Journal of Equine Veterinary Science* **32** 346-351.

Teitelbaum SL et Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews. Genetics* **4** 638-649.

Thatcher C, Pleasant R, Geor R et Elvinger F (2012) Prevalence of Overconditioning in Mature Horses in Southwest Virginia during the Summer. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **26** 1413-1418.

Thiruvenkadan A, Kandasamy N et Panneerselvam S (2009a) Inheritance of racing performance of Thoroughbred horses. *Livestock Science* **121** 308-326.

Thiruvenkadan A, Kandasamy N et Panneerselvam S (2009b) Inheritance of racing performance of trotter horses: An overview. *Livestock Science* **124** 163-181.

Thomas D, Udagawa N, Hards D, Quinn J, Moseley J, Findlay D et Best J (1998) Insulin receptor expression in primary and cultured osteoclast-like cells. *Bone* **23** 181-186.

Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B et Riggs BL (1999) Leptin Acts on Human Marrow Stromal Cells to Enhance Differentiation to Osteoblasts and to Inhibit Differentiation to Adipocytes [1]. *Endocrinology* **140** 1630-1638.

Thompson JR, Valleau JC, Barling AN, Franco JG, DeCapo M, Bagley JL et Sullivan EL (2017a) Exposure to a High-Fat Diet during Early Development Programs Behavior and Impairs the Central Serotonergic System in Juvenile Non-Human Primates. *Frontiers in Endocrinology* **8**.

Thompson JR, Valleau JC, Barling AN, Franco JG, DeCapo M, Bagley JL et Sullivan EL (2017b) Exposure to a High-Fat Diet during Early Development Programs Behavior and Impairs the Central Serotonergic System in Juvenile Non-Human Primates. *Frontiers in Endocrinology* **8** 164.

Thorens B (2014) GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* **58** 221-232.

Thorson J, Karren B, Bauer M, Cavinder C, Coverdale J et Hammer C (2010) Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: Foaling data. *Journal of Animal Science* **88** 982-990.

Thrailkill KM, Lumpkin CK, Bunn RC, Kemp SF et Fowlkes JL (2005) Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **289** E735-45.

Tischner M (1985) Embryo recovery from Polish pony mares and preliminary observations on foal size after transfer of embryos to large mares. *Equine Veterinary Journal* **17** 96-98.

Tischner M (2000) Maternal influence on pre- and postnatal growth of foals born after embryo transfer. *Journal of reproduction and fertility Supplement* **56** 705-708.

Tischner M et Klimczak M (1989) The development of Polish ponies born after embryo transfer to large recipients. *Equine Veterinary Journal* **21** 62-63.

Tomas E, Tsao T-S, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc CC, Itani SI, Lodish HF et Ruderman NB (2002) Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America **99** 16309-16313.

Toranõ EG, Garciá MG, Fernández-Morera JL, Ninõ-Garciá P et Fernández AF (2016) The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. *BioMed Research International* **ID 2568635** 17.

Toro AR, Maymó JL, Ibarbalz FM, Pérez A, Maskin B, Faletti AG, Margalet VS et Varone CL (2014) Leptin is an anti-apoptotic effector in placental cells involving p53 downregulation. *PLoS ONE* **9** e99187.

Toro AR, Pérez-Pérez A, Corrales Gutiérrez I, Sánchez-Margalet V et Varone CL (2015) Mechanisms involved in p53 downregulation by leptin in trophoblastic cells. *Placenta* **36** 1266-1275.

Toth F, Frank N, Elliott S, Perdue K, Geor R et Boston R (2009) Optimisation of the frequently sampled intravenous glucose tolerance test to reduce urinary glucose spilling in horses. *Equine Veterinary Journal* **41** 844-851.

Trotter G et McIlwraith C (1981) Osteochondritis dissecans and subchondral cystic lesions and their relationship to osteochondrosis in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science* **1** 157-162.

Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A et Margioris AN (2005) Adiponectin induces TNF-a and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **335** 1254-1263.

Tudurí E, Marroquí L, Soriano S, Ropero AB, Batista TM, Piquer S, López-Boado MA, Carneiro EM, Gomis R, Nadal A *et al.* (2009) Inhibitory effects of leptin on pancreatic alpha-cell function. *Diabetes* **58** 1616-1624.

Tyler SJ (1972) The Behaviour and Social Organization of the New Forest Ponies. *Animal Behaviour Monographs* **5** 87-196.

Urschel K, Geor R, Waterfall H, Shoveller A et McCutcheon L (2010) Effects of leucine or whey protein addition to an oral glucose solution on serum insulin, plasma glucose and plasma amino acid responses in horses at rest and following exercise. *Equine Veterinary Journal* **42** 347-354.

Valenzuela O, Jellyman J, Allen V, Holdstock N et Fowden A (2015) Effects of maternal dexamethasone treatment on pancreatic b cell function in the pregnant mare and postnatal foal. *Equine veterinary journal* **49** 1-8.

Valera M, Blesa F, Santos R Dos et Molina A (2006) Genetic study of gestation length in andalusian and arabian mares. *Animal Reproduction Science* **95** 75-96.

Valerio G, Gallè F, Mancusi C, Di Onofrio V, Guida P, Tramontano A, Ruotolo E et Liguori G (2012) Prevalence of overweight in children with bone fractures: a case control study. *BMC Pediatrics* **12** 681.

Valette J-P, Paragon B-M, Banchard G, Robert C et Denoix J-M (2004) Feeding practices and prevention of developmental diseases. In *The growing horse : nutrition and prevention of growth disorders*, p 320. Éd V Julliand et W Martin-Rosset. Dijon.

Vazquez J, Esteller-Vico A, Irizarri A, Liu I et Troedsson M (2015) Influence of stallion, donor and recipient mare's height and parity in foal height from birth to three years old in an embryo transfer program. A retrospective study. In *14th International Congress of the World Equine Veterinary Association WEVA*.

Verhaar N, Rogers C, Gee E, Bolwell C et Rosanowski S (2014) The Feeding Practices and Estimated Workload in a Cohort of New Zealand Competition Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **34** 1257-1262.

Verheyen K, Price J et Wood J (2007) Fracture rate in Thoroughbred racehorses is affected by dam age and parity. *Veterinary Journal* **174** 295-301.

Verheyen K, Price J et Wood J (2009) Exercise during training is associated with racing performance in Thoroughbreds. *Veterinary Journal* **181** 43-47.

Vermorel M, Martin-Rosset W et Jarrige R (1984) Métabolisme et besoins énergétiques. In *Le cheval. Reproduction, sélection, alimentation, exploitation*, p 239-276. Éd R Jarrige et W Martin-Rosset. INRA.

Vermorel M, Martin-Rosset W et Vernet J (1991) Energy utilization of two diets for maintenance by horses; agreement with the new French net energy system. *Journal of Equine Veterinary Science* **11** 33-35.

Verwilghen D, Janssens S, Busoni V, Pille F, Johnston C et Serteyn D (2013) Do developmental orthopaedic disorders influence future jumping performances in Warmblood stallions ? *Equine Veterinary Journal* **45** 578-581.

Vestergaard P (2007) Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes - A meta-analysis. *Osteoporosis International* **18** 427-444.

Vick M, Sessions D, Murphy B, Kennedy E, Reedy S et Fitzgerald B (2006) Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: Effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. *Reproduction, Fertility and Development* **18** 609-617.

Vick M, Adams A, Murphy B, Sessions D, Horohov D, Cook R, Shelton B et Fitzgerald B (2007) Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of Animal Science* **85** 1144-1155.

Vick MM, Murphy B a, Sessions DR, Reedy SE, Kennedy EL, Horohov DW, Cook RF et Fitzgerald BP (2008) Sensitivity in Horses and Inflammatory Cytokine Expression in Adipose Tissue. *American Journal of Vterinary Research* **69** 130-139.

Villela L, Mota M et Oliveira H (2002) Genetic parameters of racing performance traits of Quarter horses in Brazil. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **119** 229-234.

Vincze B, Kutasi O, Baska F et Szenci O (2015) Pregnancy-associated changes of serumbiochemical values in Lipizzaner broodmares. *Acta Veterinaria Hungarica* **63** 303-316.

Visser E, Neijenhuis F, de Graaf-Roelfsema E, Wesselink H, de Boer J, van Wijhe-Kiezebrink M, Engel B et van Reenen C (2014) Risk factors associated with health disorders in sport and leisure horses in the Netherlands. *Journal of Animal Science* **92** 844-855.

Vonnahme KA, Hess BW, Hansen TR, Mccormick RJ, Rule DC, Moss GE, Murdoch WJ, Nijland MJ, Skinner DC, Nathanielsz PW *et al.* (2003) Maternal Undernutrition from Early- to Mid- Gestation Leads to Growth Retardation , Cardiac Ventricular Hypertrophy ... Cardiac Ventricular Hypertrophy , and Increased Liver Weight in the Fetal Sheep. *Biology of Reproduction* **69** 133-140.

Vonnahme KA, Zhu MJ, Borowicz PP, Geary TW, Hess BW, Reynolds LP, Caton JS, Means WJ et Ford SP (2007) Effect of early gestational undernutrition on angiogenic factor expression and vascularity in the bovine placentome. *Journal of Animal Science* **85** 2464-2472.

Vos N (2008) Incidence of osteochondrosis (dissecans) in Dutch warmblood horses presented for pre-purchase examination. *Irish veterinary journal* **61** 33-37.

De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D et Schuit F (1995) Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *The Journal of clinical investigation* **96** 2489-2495.

Voute L, Henson F, Platt D et Jeffcott L (2012) Osteochondrosis lesions of the lateral trochlear ridge of the distal femur in ponies. *The Veterinary Record* **168** 265.

Wabitsch M, Blum W, Muche R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W et Hauner H (1997) Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *Journal of Clinical Investigation* **100** 808-813.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P *et al.* (2003) Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *The Journal of biological chemistry* **278** 40352-40363.

Wallace J, Milne J, Adam C et Aitken R (2017) Impact of donor and recipient adiposity on feto-placental growth in adolescent sheep. *Reproduction* **153** 381-394.

Waller C, Thompson D, Cartmill J, Storer W et Huff N (2006) Reproduction in high body condition mares with high versus low leptin concentrations. *Theriogenology* **66** 923-928.

Waller A, Burns T, Mudge M, Belknap J et Lacombe V (2011a) Insulin Resistance Selectively Alters Cell-Surface Glucose Transporters but not their Total Protein Expression in Equine Skeletal Muscle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **25** 315-321.

Waller A, Kohler K, Burns T, Mudge M, Belknap J et Lacombe V (2011b) Naturally occurring compensated insulin resistance selectively alters glucose transporters in visceral and subcutaneous adipose tissues without change in AS160 activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812** 1098-1103.

Waller A, George M, Kalyanasundaram A, Kang C, Periasamy M, Hu K et Lacombe V (2013) GLUT12 functions as a basal and insulin-independent glucose transporter in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832** 121-127.

Wallin L, Strandberg E, Philipsson J et Dalin G (2000) Estimates of longevity and causes of culling and death in Swedish warmblood and coldblood horses. *Livestock Production Science* **63** 275–289.

Wallin L, Strandberg E et Philipsson J (2001) Phenotypic relationship between test results of Swedish Warmblood horses as 4-year-olds and longevity. *Livestock Production Science* **68** 97-105.

Walsh JM, Byrne J, Mahony RM, Foley ME et McAuliffe FM (2014) Leptin, fetal growth and insulin resistance in non-diabetic pregnancies. *Early Human Development* **90** 271-274.

Walton A et Hammond J (1938) The maternal effects on growth and conformation in Shire horse-Shetland pony crosses. *Proceedings of the Royal Society of London* **125** 311-335.

Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett J et Klip A (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Molecular and cellular biology* **19** 4008-4018.

Wang Y, Ali Y, Lim C, Hong W, Pang Z et Han W (2014) Insulin-stimulated leptin secretion requires calcium and PI3K-Akt activation. *Biochemical Journal* **458** 491-498.

Watson R et Pessin J (2001) Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent progress in hormone research* **56** 175-193.

van Weeren P (2006) Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). *Clinical Techniques in Equine Practice* **5** 248-258.

Weigert C, Hennige AM, Lehmann R, Brodbeck K, Baumgartner F, Schaüble M, Häring HU et Schleicher ED (2006) Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **281** 7060-7067.

Westervelt R, Stouffer J, Hintz H et Schryver H (1976) Estimating Fatness in Horses and Ponies. *Journal of Animal Science* **43** 781.

White MF (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **283** E413-22.

Whorwood CB, Firth KM, Budge H et Symonds ME (2016) Maternal Undernutrition during Early to Midgestation Programs Tissue-Specific Alterations in the Expression of the Glucocorticoid Receptor , 11 ␢ -Hydroxysteroid Receptor in Neonatal Sheep *. **142** 2854-2864.

Wijesekara N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, Suhail A, Sweeney G et Wheeler M (2010) Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. *Journal of Biological Chemistry* **285** 33623-33631.

Wilcox G (2005) Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* **26** 19-39.

Williams GA, Wang Y, Callon KE, Watson M, Lin J, Lam JBB, Costa JL, Orpe A, Broom N, Naot D *et al.* (2009) *In Vitro* and *in Vivo* Effects of Adiponectin on Bone. *Endocrinology* **150** 3603-3610.

Williams GA, Callon KE, Watson M, Costa JL, Ding Y, Dickinson M, Wang Y, Naot D, Reid IR et Cornish J (2011) Skeletal phenotype of the leptin receptor-deficient db/db mouse. *Journal of Bone and Mineral Research* **26** 1698-1709.

Wilsher S et Allen W (2003) The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Veterinary Journal* **35** 476-483.

Wilsher S et Allen W (2006) Effects of a Streptococcus equi infection--mediated nutritional insult during mid-gestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. *Equine veterinary journal* **38** 549-557.

Wilsher S, Allen W et Wood J (2006) Factors associated with failure of thoroughbred horses to train and race. *Equine Veterinary Journal* **38** 113-118.

Wilson TB, Faulkner DB et Shike DW (2016) Influence of prepartum dietary energy on beef cow performance and calf growth and carcass characteristics. *Livestock Science* **184** 21-27.

Winkelsett S, Vervuert I, Granel M, Borchers A et Coenen M (2006) Feeding practice in warmboold mares and foals and the incidence to osteochondrosis. In *Applied equine nutrition: Equine Nutrition Conference (ENUCO)*. Éd A Lindner. Hannover: Wageningen Academic Publishers.

Winter GHZ, Rubin MIB, De La Corte FD et Silva CAM (2007) Gestational Length and First Postpartum Ovulation of Criollo Mares on a Stud Farm in Southern Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science* **27** 531-534.

Winzell M, Nogueiras R, Dieguez C et Ahrén B (2004) Dual action of adiponectin on insulin secretion in insulin-resistant mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321** 154-160.

Wiske P, Wentworth S, Norton J, Epstein S, Johnston C, Wiske P, Wentworth S, Norton J, Epstein S et Johnston C (1982) Evaluation of bone mass and growth in young diabetics. *Metabolism* **31** 848-854.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B et Tilg H (2004) Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **323** 630-635.

Woo JG, Dolan LM, Daniels SR, Goodman E et Martin LJ (2005) Adolescent Sex Differences in Adiponectin Are Conditional on Pubertal Development and Adiposity. *Obesity Research* **13** 2095-2101.

Wood S, Allen E, Corr A, Lee M et Magee A (2016) Ability of horse and pony owners to estimate body weight and assess body condition score. In *European Equine Health & Nutrition Congress 8th Edition*, p 124-126.

Wooding P et Burton G (2008) *Comparative Placentation*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Wooding F, Morgan G, Fowden A et Allen W (2000) Separate Sites and Mechanisms for Placental Transport of Calcium, Iron and Glucose in the Equine Placenta. *Placenta* **21** 635-645.

Wooding FBP, Morgan G, Fowden AL et Allen WR (2001) A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. *Placenta* **22** 749-767.

Wooldridge A, Edwards H, Plaisance E, Applegate R, Taylor D, Taintor J, Zhong Q et Judd R (2012) Evaluation of high-molecular weight adiponectin in horses. *American Journal of Veterinary Research* **73** 1230-1240.

World Health Organization (2000) *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.* In *World Health Organization technical report series*.

World Horse Welfare et Eurogroup 4 Animal (2015) *Removing the Blinkers : The health and welfare of european equidae in 2015*.

Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Jethwa PH, Kennedy AR, Murphy KG, Stanley SA, Zollner AN, Ghatei MA et Bloom SR (2002) Hypothalamic Actions of Neuromedin U. *Endocrinology* **143** 4227-4234.

Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R et Goldstein BJ (2003) Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* **52** 1355-1363.

Wu Y, Tu Q, Valverde P, Zhang J, Murray D, Dong L, Cheng J, Jiang H, Rios M, Morgan E *et al.* (2014a) Central adiponectin administration reveals new regulatory mechanisms of bone metabolism in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **306** E1418-30.

Wu D, Liu J, Pang X, Wang S, Zhao J, Zhang X et Feng L (2014b) Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-?? *International Journal of Molecular Medicine* **34** 1706-1712.

Wyse C, McNie K, Tannahil V, Love S et Murray J (2008) Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. *Veterinary Record* **162** 590-591.

Xi W, Satoh H, Kase H, Suzuki K et Hattori Y (2005) Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation

of the PI3–Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: Vasorelaxation in response to globular adiponectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **332** 200-205.

Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, Bonewald L, Manolagas SC et O'Brien CA (2015) Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLOS ONE* **10** e0138189.

Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, Confavreux C, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE *et al.* (2009) A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell* **138** 976-989.

Yadav A, Kataria M, Saini V et Yadav A (2013) Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta* **417** 80-84.

Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR *et al.* (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *Journal of Clinical Investigation* **110** 771-781.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N *et al.* (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* **7** 941-946.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K *et al.* (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* **8** 1288-1295.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M *et al.* (2003a) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423** 762-769.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J *et al.* (2003b) Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry* **278** 2461-2468.

Yang J, Zhang X, Wang W et Liu J (2010) Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochemistry and Function* **28** 334-341.

Ye R, Holland WL, Gordillo R, Wang M, Wang QA, Shao M, Morley TS, Gupta RK, Stahl A et Scherer PE (2014) Adiponectin is essential for lipid homeostasis and survival under insulin deficiency and

promotes ??-cell regeneration. *eLife* **3** 1-21.

Ye R, Wang M, Wang QA et Scherer PE (2015) Adiponectin-Mediated Antilipotoxic Effects in Regenerating Pancreatic Islets. *Endocrinology* **156** 2019-2028.

Yeap BB, Chubb SAP, Flicker L, McCaul KA, Ebeling PR, Beilby JP et Norman PE (2010) Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *European Journal of Endocrinology* **163** 265-272.

Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner A, Tomiyama Y *et al.* (2000) Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* **96** 1723-1732.

Yoshikawa Y, Kode A, Xu L, Mosialou I, Silva BC, Ferron M, Clemens TL, Economides AN et Kousteni S (2011) Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism. *Journal of Bone and Mineral Research* **26** 2012-2025.

Yoshizawa T, Hinoi E, Dae YJ, Kajimura D, Ferron M, Seo J, Graff JM, Kim JK et Karsenty G (2009) The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. *Journal of Clinical Investigation* **119** 2807-2817.

Ytrehus B, Carlson C et Ekman S (2007) Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Veterinary Pathology* **44** 429-448.

Zachut M, Honig H, Striem S, Zick Y, Boura-Halfon S et Moallem U (2013) Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *Journal of dairy science* **96** 5656-5669.

Zaidi M (2007) Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine* **13** 791-801.

Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M et Nathanielsz PW (2014) Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **382** 538-549.

Zaretsky M V., Alexander JM, Byrd W et Bawdon RE (2004) Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstetrics and Gynecology* **103** 546-550.

Zeng G, Nystrom F, Ravichandran L, Cong L, Kirby M, Mostowski H et Quon M (2000) Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in

human vascular endothelial cells. *Circulation* **101** 1539-1545.

Zhang S et Kim K (1995) TNF-a inhibits glucose-induced insulin secretion in a pancreatic fl-cell line. *FEBS Letters* **377** 237-239.

Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ et Ye J (2008) S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-α signaling through IKK2. *Journal of Biological Chemistry* **283** 35375-35382.

Zhang L, Long N, Hein S, Ma Y et Nathanielsz, Ford S (2012) Maternal obesity in the ewe results in reduced fetal pancreatic β-cell numbers in late gestation, and decreased circulating insulin concentration at term. *Domestic Animal Endocrinology* **40** 30-39.

Zhao L, Huang J, Zhang H, Wang Y, Matesic L, Takahata M, Awad H, Chen D et Xing L (2011) Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **29** 1601-1610.

Zhou B, Li H, Xu L, Zang W, Wu S et Sun H (2013) Osteocalcin Reverses Endoplasmic Reticulum Stress and Improves Impaired Insulin Sensitivity Secondary to Diet-Induced Obesity Through Nuclear Factor-κB Signaling Pathway. *Endocrinology* **154** 1055-1068.

Zhou Z, Xu M-J et Gao B (2015) Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular and Molecular Immunology* **13** 1-15.

Zhu M, Du M, Nijland M, Nathanielsz P, Hess B, Moss G et Ford S (2009) Down-Regulation of Growth Signaling Pathways Linked to a Reduced Cotyledonary Vascularity in Placentomes of Over-Nourished, Obese Pregnant Ewes. *Placenta* **30** 405-410.

Zhu MJ, Ma Y, Long NM, Du M et Ford SP (2010) Maternal obesity markedly increases placental fatty acid transporter expression and fetal blood triglycerides at midgestation in the ewe. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **229** 1224-1231.

Zoch ML, Clemens TL et Riddle RC (2016) New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* **82** 42- 49.

Titre : Influence du métabolisme maternel sur la fonction placentaire et la santé du poulain

Mots clés : DOHaD, placenta, Cheval, Nutrition, Métabolisme, programmation développementale

Résumé : L'économie de la filière équine repose aujourd'hui sur la production de chevaux athlètes performants sur le long terme. Le métabolisme de la jument gestante peut programmer le développement du poulain, sa santé à long terme et donc ses performances sportives à l'âge adulte. De nombreuses pratiques d'élevage peuvent modifier le métabolisme maternel, telles que la nutrition durant la gestation, la surnutrition durant la vie de la jument (surpoids et obésité) et le nombre de poulains produits par la jument (parité). L'objectif de ce travail était d'étudier les effets du métabolisme maternel durant la gestation sur la fonction et la structure placentaire à terme, la croissance osseuse, le métabolisme énergétique, l'inflammation systémique et le statut ostéoarticulaire des poulains en croissance. Un premier modèle de perturbation nutritionnelle en fin de gestation a été développé en comparant des juments ayant ingéré uniquement des fourrages au cours de la gestation ou bien des fourrages et des concentrés à partir de la mi-gestation. Ce modèle a permis de montrer que la supplémentation en concentrés altérait le métabolisme glucidique maternel, la fonction placentaire ainsi que le statut ostéoarticulaire et la réponse métabolique à un challenge de surnutrition chez le poulain. D'autre part, une perte d'état trop importante associée à une qualité/quantité de foin insuffisante entrainait un retard de maturité des fonctions de métabolisme énergétique et de reproduction mâle chez les poulains. Un deuxième modèle a ensuite été développé pour étudier l'effet de la primiparité. Cette étude a confirmé que la croissance fœtale des poulains issus des juments primipares était réduite et que ces poulains demeuraient plus petits avec un métabolisme glucidique et une maturation testiculaire retardés par rapport aux poulains issus de juments multipares. Le troisième modèle développé s'est intéressé à l'effet de l'obésité maternelle dès la conception. En effet, la prévalence de surpoids et d'obésité est de plus en plus importante au sein de la filière équine. Ce dernier modèle a permis de montrer que l'obésité maternelle associée à une résistance à l'insuline et une inflammation systémique augmentées entrainait une augmentation de la résistance à l'insuline, de l'inflammation systémique et du développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains. L'ensemble de ces résultats met en avant la relation entre la résistance à l'insuline maternelle, l'inflammation maternelle et le développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains durant la croissance, mais également entre sous-nutrition utérine et retard de maturité. Ces observations vont permettre de développer de nouvelles recommandations nutritionnelles pour les poulinières.

Title : Influence of maternal metabolism on placental function and health of foal

Keywords : DOHaD, placenta, horse, nutrition, metabolism, developmental programming

Abstract : The economy of the equine industry is based on the production of high performance athlete horses. The metabolism of the pregnant mare can program the development of the foal, its long-term health and therefore its athletic performance at adulthood. Many breeding practices can modify maternal metabolism, such as nutrition during pregnancy, overnutrition during the mare's productive life (overweight and obesity) and the number of foals produced by the mare (parity). The aim of this work was to study the effects of maternal metabolism during pregnancy on placental function and structure, as well as bone growth, energy metabolism, systemic inflammation and osteoarticular status in growing foals. In a first approach, mares fed with forage only during gestation were compared to mares fed forage and concentrates from mid-gestation. Supplementation with concentrates altered maternal carbohydrate metabolism and placental function. In weaned foals, the osteoarticular status and the metabolic response to an overnutrition were also affected by the use of concentrates in maternal nutrition. Conversely, mares fed forage only lost body condition, which led to a delay in the post-natal maturation in terms of energy metabolism and testicular function in foals. In a second approach, the effect of primiparity was studied. Foals born to primiparous mares were growth restricted at birth and had a long-term maturational delay in bone growth, carbohydrate metabolism and testicular function. Finally, given the current high prevalence of overweight and obesity in the equine species, the effects of maternal obesity were studied. Maternal obesity associated with increased maternal insulin resistance and systemic inflammation resulted in increased insulin resistance, systemic inflammation, and increased incidence of osteochondrosis in foals. Altogether, these results highlight the relationship between maternal insulin resistance, maternal inflammation and the development of osteochondrosis lesions in foals during growth, but also between in utero undernutrition and maturation delay. These observations will contribute to adjust nutritional recommendations to broodmares.

NNT : 2017SACLA029

Influence du métabolisme maternel sur la fonction placentaire et la santé du poulain
ANNEXES

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Jouy en Josas, le 19/10/2017, par

Morgane Robles

Composition du Jury :

Corinne Cotinot Directeur de recherche, INRA (UMR 1198 BDR)	Président
Ann Van Soom Professeur, Université de Ghent	Rapporteur
Francesco Camillo Professeur, Université de Pise	Rapporteur
Madia Charlier Chargé de recherche, INRA (UMR 1313 GABI)	Examinateur
Eric Palmer Retraité	Examinateur
Dominik Burger Vétérinaire, Université de Bern	Examinateur
Pascale Chavatte-Palmer Directeur de recherche, INRA (UMR 1198 BDR)	Directeur de thèse
Anne Couturier-Tarrade Chargé de recherche, INRA (UMR 1198 BDR)	Co-Directeur de thèse

Thèse de doctorat

Présentation

Lors de cette thèse j'ai rédigé ou participé à la rédaction d'articles concernant les travaux du projet FOETALIM mais ne faisant pas partie directement du projet de thèse :

- J'ai rédigé deux articles originaux complétant le travail de Pauline Peugnet sur les transferts d'embryon inter-races :

Article 1 : Morgane Robles, Pauline Peugnet, Sarah Valentino, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Marie-Christine Aubrière, Francis Reigner, Didier Serteyn, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. **Placental structure and function in different breeds in horses**. Theriogenology (soumis, en révision).

Article 2 : Morgane Robles, Pauline Peugnet, Sarah Valentino, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Marie-Christine Aubrière, Francis Reigner, Didier Serteyn, Laurence Wimel, Anne Couturier-Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. (2017) **Placental alterations in structure and function in intra-uterine growth-retarded horses.** Equine Veterinary Journal, *In Press*.

- J'ai participé à la rédaction de l'article original présentant les résultats du modèle 1 sur la gestation des juments et le développement des poulains avant le sevrage :

Article 3 : Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Luis Mendoza, Laurence Wimel, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Daniel Guillaume, Sylvaine Camous, Valérie Berthelot, Marie-Pierre Toquet, Eric Richard, Charlotte Sandersen, Stéphane Chaffaux, Jean-Phillipe Lejeune, Anne Tarrade, Didier Serteyn, Pascale Chavatte-Palmer. (2015). **Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre-weaning horses.** PLOS One 10;4:e0122596. DOI: 10.1371/journal.pone.0122596

- J'ai participé à la rédaction de revues sur la programmation développementale dans l'espèce équine :

Revue 1 : Morgane Robles, Pascale Chavatte-Palmer. (2017). **Does maternal size, nutrition and metabolic status affect offspring production traits in domestic species?** Animal Reproduction 14:3,528-537. DOI: 10.21451/1984-3143-AR996

Revue 2 : Pascale Chavatte-Palmer, Pauline Peugnet, **Morgane Robles.** (2017). **Developmental programming in equine species: relevance for the horse industry.** Animal Frontiers 7:48-54. DOI: 10.2527/af.2017-0128

Revue 3 : Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer. (2016). **Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring.** Theriogenology 86;1:99-109. DOI : 10.1016/j.theriogenology.2016.01.028.

Revue 4 : Pascale Chavatte-Palmer, **Morgane Robles,** Anne Tarrade, Véronique Duranthon. (2016). **Gametes, embryos, and their epigenome : considerations for equine embryo technologies.** Journal of Equine Veterinary Science 41:13-21. DOI: 10.1016/j.jevs.2016.03.019.

Revue 5 : Pascale Chavatte-Palmer, Christophe Richard, Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Delphine Rousseau-Raillard, Anne Tarrade. (2015). **The developmental origins of health and disease : importance for animal production.** Animal Reproduction 12;3:505-520.

- J'ai rédigé deux articles de vulgarisation pour la Journée de la Recherche Equine et pour le Groupement pour l'Amélioration de l'Elevage de Trotteur Français. Ces articles ont été associés à des communications orales devant les éleveurs.

Vulgarisation 1 : **Morgane Robles**, Camille Gautier, Pauline Peugnet, Luis Mendoza, Cédric Dubois, Jean-Philippe Lejeune, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Hélène Bouraïma-Lelong, Pascale Chavatte-Palmer. **L'alimentation de la jument en gestation et du poulain en croissance est primordiale pour le bon développement du poulain et sa future carrière sportive et peut-être reproductive : bilan du projet Foetalim 2.** 43ème Journée de la Recherche Equine. 16/03/2017, Paris, France.

Vulgarisation 2 : **Morgane Robles**, Pascale Chavatte-Palmer. La santé du poulain se prépare dès la gestation. (2017). Groupement pour l'Amélioration de l'Elevage de Trotteur Français (GAET). Bulletin n°155, janvier 2017.

Articles originaux

Article 1 : Placental alterations in structure and function in intra-uterine growth-retarded horses

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Sarah Valentino, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Marie-Christine Aubrière, Francis Reigner, Didier Serteyn, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer.

Soumis à Equine Veterinary Journal

Placental alterations in structure and function in intra-uterine growth-retarded horses

Robles, M.[1*], PM Peugnet[1*], SA Valentino[1], C Dubois[2], M Dahirel[1], M-C Aubrière[1], F Reigner[3], D Serteyn[4], L Wimel[2], A Tarrade[1], P Chavatte-Palmer[1+]

[1]UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France; [2]IFCE, Station Expérimentale, Chamberet, France; [3]INRA UE1297, UEPAO, Nouzilly, France; [4]Clinique équine, Faculté de Médecine Vétérinaire, CORD, Université de Liège, Liège, Belgique

* these two authors contributed equally to the publication.

Summary

Background: Following embryo transfer (ET), the size and breed of the recipient mare can affect fetal development and subsequent postnatal growth rate and insulin sensitivity in foals.

Objectives: To investigate placental adaptation in pregnancies where increased or restricted fetal growth was induced through ET between Pony, Saddlebred and Draft horses.

Study design: Control Pony (P, n=21) and Saddlebred (S, n=28) pregnancies were obtained by artificial insemination. Increased pregnancies were obtained by transferring Pony (P-D, n=6) and Saddlebred (S-D, n=8) embryos into Draft mares. Restricted pregnancies were obtained by transferring Saddlebred embryos into Pony mares (S-P, n=6).

Methods: Placental weight and surface were recorded and samples collected for stereology and analysis of expression of genes involved in placental growth, vascularization and nutrient transport. Data were analyzed by linear model.

Results: S-P foals were growth retarded compared to controls despite increased gestational length. Placental weight was reduced but placental surface density and volume fraction were increased. Placental expression of genes involved in growth and development and nutrient transfer was strongly reduced. In contrast, placental size and weight were increased in enhanced growth P-D and S-D foals. The trophoblastic surface density and the allantoic vessels surface density were decreased in P-D and S-D, respectively, both with very few modifications in gene expression.

Main limitations: Control embryos were produced by artificial insemination whereas experimental embryos were produced by ET.

Conclusions: Placental structure and gene expression are modified after ET into a smaller or larger breed than that of the embryo. These adaptations contribute to the observed phenotype of foal growth restriction or enhanced growth at birth.

Introduction

Epidemiological studies in humans [1] and experiments in non-equine animals [2–5] have evidenced that preconceptional and gestational environmental conditions induce physiological adaptations in the offspring that persist postnatally and increase the risks of developing non-communicable diseases at adulthood. A U-shaped curve of risk has been observed, with both individuals born small and large being affected [6,7]. These Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) also apply to the horse [8–11].

The placenta plays a pivotal role in transmitting *stimuli* from the maternal environment to the fetus [12–15]. Placental function varies according to placental size, morphology, blood flow, nutrient transporter abundance and intrinsic nutrient consumption and production [12,13,16]. In equids, placentation is non-invasive, diffuse and epitheliochorial. Microcotyledons with intense branching maximize the contact surface between endometrium and trophoblast for haemotrophic exchanges. Histotrophic exchanges take place in-between microcotyledonary units, where pseudo-stratified trophoblastic cells are specifically adapted to absorb the exocrine material from the uterine glands [17–19].

An estimated 21,359 equine embryos were transferred in the world in 2015 [20]. Recipient mares are mostly chosen for economical or practical (character, availability) reasons and are often of a different size and breed than the embryo. Manipulation of fetal growth through embryo transfers between ponies and Thoroughbreds showed that metabolic and stress responses are affected in growth-enhanced and growth-restricted newborn foals [21,22], with effects on body size persisting up to three years of age [23,24]. Placental structure was pointed out as the primary control mechanism for the observed alterations in foal growth and metabolism [23] but functional mechanisms associated with these structural changes were not investigated.

The present study follows up from previous work where pony or Saddlebred embryos were transferred into draft mares and Saddlebred embryos transferred into pony mares [25]. Postnatally, enhanced growth pony foals remained taller than pony controls until 18 months of age whereas restricted Saddlebred foals partially caught up to Saddlebred controls

[25,26]. Early insulin-resistance and subsequent lower basal glycaemia were observed in enlarged ponies compared to pony controls. In contrast, restricted Saddlebred foals initially developed increased insulin sensitivity that persisted until 7 months. They remained hyperglycemic compared to Saddlebred controls until 18 months of age [25].

Here, we evaluated placental adaptations (placental biometry, histological structure, expression of genes involved in growth, vascularization and nutrient transfer processes) to possibly relate them to the post-natal development of foals.

Materials and methods

Animal studies were approved by the local animal care and use committee and received ethical approval from the local ethics committee (approval N°5-2013-5).

The study was conducted over 2 successive breeding seasons (2011 & 2012 foalings) (Table 1). Welsh Pony mares (P, n=27) were housed and P embryos (n=61) were produced in experimental farm 1 (47°32'36.12''N, 0°44'38.96''E, 120 m). Anglo-Arabian Saddlebred (S, n=28) and draft Breton (D, n=22) mares were housed and S embryos (n=48) were produced in the experimental farm 2 (45°34'55.17''N, 1°43'16.29''E, 442 m). Age, parity and size of the mares are shown in Table 1. The experimental protocol is summarized in Figure 1 as described previously [25].

Control pregnancies

Pony-in-Pony (P-P, n=21) and Saddlebred-in-Saddlebred (S-S, n=28) pregnancies were obtained by artificial insemination using semen from one pony (Welsh) and two Saddlebred (Anglo-Arabian) stallions, respectively.

Experimental pregnancies

Pony-in-Draft (P-D, n=6), Saddlebred-in-Pony (S-P, n=6) and Saddlebred-in-Draft (S-D, n=8) pregnancies were obtained by embryo transfer (ET) as described previously [25]. Pony control and experimental foals were produced using the same stallion. Saddlebred embryos were produced by two different stallions depending on the breeding season but both stallions produced experimental and control foals. Briefly, embryos were recovered 7 days after ovulation, washed in Emcare Holding® solution (ICPbio), transported in Equitainer® (Hamilton Research) to the other experimental farm (3-4 hours) and transferred immediately into synchronized recipients 5 to 7 days after ovulation. Pregnancy was diagnosed 7 days after ET by ultrasonography.

Management of mares and placental sampling

From ovulation, mares were kept in pasture with free access to mineral salts. From the 5th gestational month, they were housed in boxes and fed a diet based on straw and hay with concentrates in farm 1 and homemade pellets and hay in farm 2, with free access to mineral salts (Supplementary Table 1).

At delivery, all placentas (allantochorion) were sampled near the umbilical cord: 1 cm² fragments were fixed in 4% formaldehyde for histological analysis and 3 mm² fragments were snap-frozen in liquid nitrogen for molecular analysis. The foal and the placenta associated to amnion and cord (total fetal membranes - TFM) were weighed the next morning. The gross placental surface area was measured by applying a clear Plexiglas sheet marked with 10cmx10cm squares on placentas laid in the “F” configuration, revealing both uterine horns and the uterine body (Figure 2) [23]. Photographs were taken and the placental surface subsequently measured using the ImageJ® software (National Institute of Health). What corresponded to 10cm in the picture was set as a pixel scale. The placental surface was subsequently measured as the area calculated by drawing the contour of the placenta, multiplied by 2.

Histological and stereological analyses

Placental samples were embedded in paraffin, cut in 7µm sections, stained with hematoxylin/eosin and scanned using NanoZoomer Digital Pathology® (Hamamatsu Photonics). Stereology is a quantitative method that enables the calculation of three dimensional structural quantities (number, length, area and volume) from two-dimensional sectional images. Relative surface (Sv, μ^{-1}) and relative volume (Vv, %) of the different components of the placentas were measured using the One Stop Stereology software (MercatorPro®, ExploraNova, [27]).

As presented in Figure 3, the components measured were:
-For the microcotyledonary part: Both the haemotrophic and histotrophic trophoblasts labelled as “trophoblast”, the microcotyledonary vessels and the whole microcotyledons (by adding the measures of the trophoblasts and the microcotyledonary vessels)
-For the allantoic part: the allantoic tissue vessels and the allantoic connective tissue.

Gene expression analysis

Total RNA from placental samples was isolated as previously described [28] and purified using the RNeasy® Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and real time quantitative PCR were performed as previously described [29]. Gene-specific primers of gene analysed are shown in Table 2. The expression of the following genes was measured:

Growth and development: *Insulin-like growth factor 2* (*IGF2)*, a regulator of fetal and placental development, *Insulin-like growth factor 1 receptor* (*IGF1R),* a receptor that modulates IGF-2 action*, Insuline-like growth factor 2 receptor (IGF2R)*, a receptor involved in the signalling pathway of IGF2 degradation, *transforming growth factor β1* (*TGFβ1)*, that regulates cell proliferation and differentiation and *H19* that encodes a non-coding RNA acting as a negative regulator of cell proliferation.

Nutrient transfer: *Solute carrier family 2 member 1* (*SLC2A1),* a glucose transporter non-insulin dependent, *Solute carrier family 38 member 1* (*SLC38A1)* and *Solute carrier family 38 member 2 (SLC38A2)*, two transporters involved in neutral amino acids transfers, *LPL*, a lipoprotein lipase and *cluster of differentiation 36* (*CD36)*, involved in the transfer of phospholipids, lipoproteins and long-chain fatty acids.

Vascularization *Vascular endothelial growth factor A* (*VEGFA)*, that promotes angiogenesis and vasculogenesis, *vascular endothelial growth factor receptor 1 (FLT1)* and *vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR)*, receptors of VEGFA that regulate negatively and positively its action, respectively, and *endothelial NOS* (*eNOS)*, an enzyme that catalyses the production of nitric oxide gaseous vasodilator.

Data were analyzed using QbasePLUS® (Biogazelle). Calibrated normalized relative quantities (CNRQ) were calculated as previously described [29]. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Ribosomal Protein L32 (RPL32)* and *Secretory Carrier Membrane Protein 3 (SCAMP3)* [30], as selected by geNorm, were used as reference genes.

Statistical analysis

Results are expressed as medians [quartile1-quartile3] and presented as boxplots (minimum to maximum). Statistical analyses were performed using R software (www.r-project.org/, version 3.3.0) using a linear model considering breed (P-P *vs* S-S) and maternal environment (P-P *vs* P-D and S-P *vs* S-S *vs* S-D). Age, parity of the dam at conception and sex of the foal were added into the statistical model and taken into consideration when statistically significant. Median, interquartile range and p-value of statistically significant co-factors are presented in Supplementary Table 2.

The effect of the breeding season could not be studied because all S-D foals were born during breeding season 1 (2011), and only one P-D foal was born during breeding season 2 (2012).

Effects were considered significant when p-values<0.05.

Results

Pregnancies (Table 1)

Altogether, 21 P-P and 28 S-S controls and 6 P-D, 6 S-P and 8 S-D experimental foals were delivered spontaneously during spring and summer (April 6th-August 13th) with >75% in May/June, all within the normal gestational age range.

Pregnancy length was not statistically different between P-D and P-P nor between S-D and S-S pregnancies. In contrast, pregnancy was 13 days longer in S-P *vs* S-S ($p<0.001$) and 16 days longer in S-P *vs* S-D ($p<0.01$).

Foals (Figure 4A)

All foals were healthy at birth, but for 3 of 6 S-P foals that needed assistance to stand and suckle immediately after birth and were bottle-fed with horse colostrum and ewe milk until first suckling. These foals presented signs of dysmaturity such as silky hair coat and joint and tendon laxity [31].

P-D foals were heavier than P-P foals (+57.3%, $p<0.0001$). S-P and S-D foals were respectively lighter (-31.2%, $p<0.0001$) and heavier (+8.9%, $p<0.001$) than S-S foals. S-P foals were lighter by 36.8% than S-D foals ($p<0.0001$).

Placental and fetal membranes biometry (Figures 4B, 4C and 4D)

TFM were heavier ($p<0.0001$) and the placenta larger ($p<0.0001$) in P-D compared to P-P. The foal/TFM weight ratio tended to be smaller in P-D compared to P-P groups ($p=0.07$). TFM weight and placental surface were respectively reduced ($p<0.001$, $p<0.0001$, respectively) and increased ($p<0.01$, $p=0.02$, respectively) in S-P and S-D compared to S-S controls. Both TFM weight and placental surface area were reduced in S-P compared to S-D ($p<0.0001$, $p<0.0001$). Nevertheless, the foal to TFM weight ratio was not different between S-P, S-S and S-D.

Placental morphometry (Supplementary Figure 1 & Figure 5)

Only the parameters that differed within a breed are presented in Figure 5. There were no gross or histologic differences observed between controls and experimental groups on histological sections.

P-D versus P-P controls: The relative trophoblastic surface density was significantly decreased in P-D *vs* controls (p=0.03) and the microcotyledonary surface density tended to be reduced in P-D (p=0.056).

S-P versus S-S controls: The relative surface density and volume fraction of microcotyledonary vessels were significantly increased in S-P vs controls (p=0.01 and p=0.03, respectively). The microcotyledonary surface density tended to be increased in S-P compared to controls (p=0.058).

S-D vs S-S controls: The relative surface density of the allantoic vessels was reduced in S-D compared to S-S placentas (p=0.045). The relative surface density of microcotyledonary vessels and trophoblast were reduced in S-D compared to S-P (p<0.01, p=0.02, respectively), resulting in reduction of the microcotyledonary surface density in S-D versus S-P (p=0.01).

Placental gene expression (Table 3 & Figure 6)

Only the parameters that differed within a breed are presented in Figure 6.

Growth and development: The expression of *H19, IGF2, IGF1R* and *IGF2R* was decreased in S-P *vs* S-S placentas (fold-change=0.71, p=0.03; fold-change=0.53, p<0.01; fold-change=0.67, p<0.01; fold-change=0.62, p=0.045, respectively). In S-P placentas, the expression of *H19* and *IGF2* was reduced compared to S-D placentas (fold-change=0.56, p=0.02 and fold-change=0.63, p=0.01, respectively).

Nutrient transfer: The expression of *SCL38A1* was increased in P-D *vs* P-P (fold-change=1.04, p=0.02). The expression of *SLC2A1, SLC38A2* and *LPL* was decreased in S-P

vs S-S (fold-change=0.71, p=0.01; fold-change=0.58, 0.03; fold-change=0.71, p=0.02, respectively). Finally, *CD36* gene expression was not different between groups.

Vascularization: *KDR* gene expression was increased in S-D compared to S-S placentas (fold-change=1.34, p=0.04). The expression of *FLT1* and *KDR* was reduced in S-P *vs* S-D (fold-change=0.76, p=0.03; fold-change=0.70, p=0.046, respectively).

Discussion

Embryo transfer into a breed of a larger/smaller size induced fetal enhanced growth or growth restriction, respectively, as observed by others [23,32–34]. Enhanced growth was associated with increased placental size and weight in ponies and Saddlebreds, whereas growth restriction was associated with a reduction in both parameters and two cases of dysmaturity. In terms of placental features, enhanced growth was associated with a decrease in the surface density of trophoblast in ponies and of allantoic vessels in Saddlebred placentas, both with little gene expression modifications. In contrast, growth restriction was associated with an increase in trophoblast surface density and volume fraction together with a strong reduction in the expression of genes involved in growth and development and nutrient transfer in Saddlebred placentas.

Intrauterine enhanced growth did not affect gestational length in pony and Saddlebred foals. Enhanced growth was associated with heavier TFM and a larger placenta in both groups. These results are consistent with previous studies using between-breed embryo transfer and crossbreeding in horses, pigs and cows [23,33–37]. Placental efficiency (as estimated by the foal/TFM weight ratio) tended to be decreased in P-D foals maybe because placental growth was driven by uterine space. As the power of the statistical test was only 36%, these differences may have become significant if there had been more animals in the P-D group. Placental efficiency was not modified in S-D foals, probably because of the relatively smaller difference between S and D size.

Pregnancy was longer in restricted S-P, as if time was unsuccessfully given to the foal to try and grow to its genetic potential. In humans, intra uterine growth retardation (IUGR) is defined as a birth weight below the tenth percentile for gestational age [38]. Here, the weight of S-P foals was 7.20kg below the 10th percentile of S-S foals' birthweight and 8.54kg below the 10th percentile of birth weight of 115 S-S foals from the same breed born between 2011 and 2015 in the same farm. Restricted S-P foals can thus be clinically considered as IUGR, which could explain the observed dysmaturity (in addition to clinical signs of dysmaturity at birth, foals presented a dysmaturity of the pancreas at 3 days of age) [28,30,31]. Indeed, their pancreatic function was immature when evaluated post-natally [25]. In Allen et *al*. experiments, IUGR foals also had symptoms of dysmaturity [23].

IUGR was associated with lighter TFM and a smaller placenta, consistent with other work in horses and pigs [23,35]. The lack of difference in placental efficiency (as estimated by the foal/TFM ratio, as used in other studies in horses and pigs [23,37,39]) between restricted foals and controls indicates that the placenta of Saddlebred foals was unable to overcome maternal uterine size constraints by structural or functional adaptations, which in turn prevented a possible dystocia.

In contrast to what was observed by others [23], trophoblast and microcotyledon surface density were reduced with fetal enhanced growth and increased in cases of IUGR. The reduced density in cases of enhanced growth may reflect placental adaptations to limit fetal growth beyond a certain threshold. This could explain why P-D foals tended to have a lower placental efficiency compared to P-P foals. Moreover, the work of Constancia et al. in mice elegantly showed that the placenta will respond to fetal demand and adjust nutrient transfer [40]. In the present situation, however, the demand from the pony foetuses may not have been sufficient to increase placental capacity. Conversely, the increased exchange surface in restricted Saddlebred foetuses may have improved nutrient supply to support fetal development. In their embryo transfer experiments, Allen et *al*. observed increased surface density in case of enhanced growth and reduced density in case of IUGR, using 10 randomly collected placental samples [23]. Here, placental structure was only analysed in one area,

near the umbilical cord, to improve standardization (in all the pregnancies, umbilical cord was attached between both horns of the placenta). This may be a major limitation of the present work as in humans, microcotyledonary development and gene expression vary between placental areas [41–44], but so far this variability has not been explored in the horse. The sampling in only one part of the placenta may thus not represent the overall placental structure and function. Moreover, both trophoblasts have been taken into account for the calculation of the relative surface and volume of the microcotyledons, unlike in the work of Allen *et al*. This difference of measure might also explain the difference of results between both studies.

The difference in gene expression between placentas from enhanced growth and control foetuses can be considered as not biologically relevant as only one gene, *SLC38A1,* was decreased in P-D vs P-P placentas but with a fold-change of x1.04. Nevertheless, term placentas only reflect the terminal result of the pregnancy and one cannot preclude that adaptations did not take place earlier in pregnancy as shown in response to adverse nutritional conditions in mice [45]. Alternatively, foetal growth may have mainly been driven by the mechanical increase in placental size due to the increased uterine capacity.

In restricted S-P pregnancies, the expression of genes involved in growth and development *(H19, IGF2*, IGF1R an IGF2R) and nutrient transfer (*SLC2A1*, *SLC38A2* and *LPL*) was reduced. These results are well associated with the lowest TFM weight and the growth restriction of the foals at birth. *H19* and *IGF2* are major regulators of placental and fetal growth, especially through *IGF1R* and *IGF2R* [46,47]. A decrease in their expression might then be linked with the IUGR in the S-P group. Moreover, the fact that H19, IGF2 and its receptor IGF2R are imprinted genes may have increased their susceptibility to be affected because of their monoallelic expression. As intrauterine growth of foals requires a high amount of glucose [48,49] and as GLUT1 and GLUT3 are glucose transporters in the horse placenta [50], a decrease in *SLC2A1* placental expression might also be linked with a lower amount of glucose transferred to the foal for growth. These results might also be linked with the delayed pancreatic maturation observed in foals from S-P group, 3 days after birth [25].

Moreover, IGF2 is known to regulate the nutrient availability and to control the expression of glucose and amino acids transporters [46]. Thus, as observed in other species, the decrease in the expression of *IGF2* is linked with the decrease of the expression of *SLC2A1* and *SLC38A1* [46]. Moreover, these results are in agreement with data in other species where IUGR has been associated with similar changes in humans, sheep and rodents [51,52].

One main limitation of this work is that control embryos were produced using artificial insemination. Nevertheless, in horses, data collected from foals and placentas born after ET or *in vivo* produced embryos or artificial insemination did not demonstrate any difference in placental nor foal size and weight at birth [53].

The other limitation is that ponies were not housed in the same farm as Saddlebred and draft mares. Nevertheless, they were all fed concentrates and hay in late gestation and their body weight and body condition remained constant throughout gestation [25]. Data from our own laboratory as well as others indicate that only severe restriction in maternal nutrition affect foal birthweight and placental size [54–58]. Thus, it may be considered that the effects of the different location may be negligible compared to effects due to differences in maternal and fetal size and breed.

Finally, age and parity are known to affect fetal and placental development with smaller foals and placentas being born to young primiparous mares [59,60]. Consequently, parity was always added to the statistical model. Results indicate that even though draft mares were significantly younger than Saddlebred and pony mares and that parity was higher in Saddlebred *vs* pony and draft mares, foals born to draft mares were heavier with heavier placentas compared to the other groups. Moreover, when foal weights were corrected for parity (+0.7 kg per parity unit [60]), differences in foal birth weight remained statistically significant.

Conclusion

Using ET between breeds of different size and weight, it was demonstrated that foal birthweight was directly related to placental weight and gross placental surface. Placental adaptations in restricted pregnancies were not sufficient to overcome the restriction imposed by the reduced maternal size, which also protected the mare and foal from severe risks of dystocia. Conversely, the reduced microcotyledonary exchange surface area in enhanced growth foetuses may also have prevented excess foetal oversize and dystocia.

Acknowledgments

The authors are grateful to Joseph Bellonie, Patrice Dupuis, Philippe Barrière, Thierry Gascogne, Thierry Blard, Yvan Gaudé and François Stieau for care and management of the mares and foals.

References

1. Hanson, M. et Gluckman, P. (2014) Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol. Rev.* **94**, 1027-76.
2. McMullen, S. et Mostyn, A. (2009) Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. *Proc. Nutr. Soc.* **68**, 306-320.
3. Chavatte-Palmer, P., Tarrade, A., Kiefer, H., Duranthon, V. et Jammes, H. (2016) Breeding animals for quality products: not only genetics. *Reprod. Fertil. Dev.* **28**, 94-111.
4. Wu, G., Bazer, F., Wallace, J. et Spencer, T. (2006) Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.* **84**, 2316.
5. Chavatte-Palmer, P., Tarrade, A. et Rousseau-Ralliard, D. (2016) Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **13**, 586.
6. Stettler, N., Zemel, B., Kumanyika, S. et Stallings, V. (2002) Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. *Pediatrics* **109**, 194-199.

7. Gluckman, P. et Hanson, M. (2004) Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **9**, 419-425.

8. Fowden, A., Jellyman, J., Valenzuela, O. et Forhead, A. (2013) Nutritional Programming of Intrauterine Development: A Concept Applicable to the Horse? *J. Equine Vet. Sci.* **33**, 295-304.

9. Peugnet, P., Robles, M., Wimel, L., Tarrade, A. et Chavatte-Palmer, P. (2016) Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. *Theriogenology* **86**, 99-109.

10. Coverdale, J., Hammer, C. et Walter, K. (2015) Nutritional programming and the impact on mare and foal performance. *J. Anim. Sci.* **93**, 3261-3267.

11. Satterfiled, M., McKnight, J., Li, X. et Wu, G. (2010) Nutrition, epigenetics, and vascular function. In: *Nutrition, epigenetic mechanisms and human disease*, Éd: N. Maulik et G. Maulik, CRC Press. p 125-134.

12. Fowden, A.L., Forhead, A.J., Coan, P.M. et Burton, G.J. (2008) The placenta and intrauterine programming. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 439-450.

13. Belkacemi, L., Nelson, D., Desai, M. et Ross, M. (2010) Maternal Undernutrition Influences Placental Fetal Development. *Biol. Reprod.* **331**, 325-331.

14. Reynolds, L. et Caton, J. (2012) Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **354**, 54-59.

15. Barker, D. et Thornburg, K. (2013) Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: A review. *Placenta* **34**, 841-845.

16. Jansson, T. et Powell, T. (2007) Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin. Sci. (London, Engl. 1979)* **113**, 1-13.

17. Steven, D. et Samuel, C. (1975) Anatomy of the placental barrier in the mare. *J. Reprod. Fertil.* **23**, 579-82.

18. Macdonald, A., Chavatte, P. et Fowden, A. (2000) Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (Equus caballus) in the latter half of gestation. *Placenta* **21**, 565-574.
19. Allen, W. (2001) Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* **121**, 513-527.
20. Perry, G. (2016) *2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*.
21. Forhead, A., Ousey, J., Allen, W. et Fowden, A. (2004) Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *J. Endocrinol.* **181**, 459-467.
22. Giussani, D., Forhead, A., Gardner, D., Fletcher, A., Allen, W. et Fowden, A. (2003) Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *J. Physiol.* **547**, 67-76. http://doi.wiley.com/10.1111/j..2002.00067.x. Consulté le février 20, 2017.
23. Allen, W., Wilsher, S., Turnbull, C., Stewart, F., Ousey, J., Rossdale, P. et Fowden, A. (2002) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* **123**, 445-453. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882022. Consulté le février 19, 2017.
24. Allen, W., Wilsher, S., Tiplady, C. et Butterfield, R. (2004) The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III postnatal growth. *Reproduction* **127**, 67-77.
25. Peugnet, P., Wimel, L., Duchamp, G., Sandersen, C., Camous, S., Guillaume, D., Dahirel, M., Dubois, C., Jouneau, L., Reigner, F., Berthelot, V., Chaffaux, S., Tarrade, A., Serteyn, D. et Chavatte-Palmer, P. (2014) Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Pre-Weaning Horses. *PLoS One* **9**, e102044.
26. Peugnet, P., Mendoza, L., Wimel, L., Duchamp, G., Dubois, C., Reigner, F., Caudron, I., Deliège, B., Toquet, M.-P., Richard, E., Chaffaux, S., Tarrade, A., Lejeune, J.-P.,

458 Serteyn, D. et Chavatte-Palmer, P. (2016) Longitudinal Study of Growth and
459 Osteoarticular Status in Foals Born to Between-Breed Embryo Transfers. *J. Equine*
460 *Vet. Sci.* **37**, 24-38.
461 27. Reed, M., Howard, C. et Yanés, G. DE (2010) One-stop stereology: the estimation of
462 3D parameters using isotropic rulers. *J. Microsc.* **239**, 54-65.
463 28. Chomzynski, P. (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium
464 Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
465 29. Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Aubrière, M.-C., Peynot, N., Dahirel, M., Bertrand-
466 Michel, J., Aguirre-Lavin, T., Morel, O., Beaujean, N., Duranthon, V. et Chavatte-
467 Palmer, P. (2013) Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a
468 high fat and control maternal diets in a rabbit model. *PLoS One* **8**, e83458.
469 30. Brosnahan, M., Miller, D., Adams, M. et Antczak, D. (2012) IL-22 Is Expressed by the
470 Invasive Trophoblast of the Equine (Equus caballus) Chorionic Girdle. *J. Immunol.*
471 **188**, 4181-4187.
472 31. Rossdale, P.D. (1976) A clinician's view of prematurity and dysmaturity in
473 thoroughbred foals. *Proc. R. Soc. Med.* **69**, 631-2.
474 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/981260. Consulté le juin 4, 2017.
475 32. Tischner, M. (1985) Embryo recovery from Polish pony mares and preliminary
476 observations on foal size after transfer of embryos to large mares. *Equine Vet. J.* **17**,
477 96-98.
478 33. Tischner, M. et Klimczak, M. (1989) The development of Polish ponies born after
479 embryo transfer to large recipients. *Equine Vet. J.* **21**, 62-63.
480 34. Walton, A. et Hammond, J. (1938) The maternal effects on growth and conformation in
481 Shire horse-Shetland pony crosses. *Proc. R. Soc. London* **125**, 311-335.
482 35. Ashworth, C., Haley, C., Aitken, R. et Wilmut, I. (1990) Embryo survival and conceptus
483 growth after reciprocal embryo transfer between Chinese Meishan and Landrace x
484 Large White gilts. *J. Reprod. Fertil.* **90**, 595-603.
485 36. Ferrell, C. (1991) Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development

in the cow.2. Blood flow and nutrient flux. *J. Anim. Sci.* **69**, 1954-1965.

37. Biensen, N., Wilson, M. et Ford, S. (1999) The impacts of uterine environment and fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in pigs. *J. Anim. Sci.* **77**, 954-959.

38. *The World Health Report 1995: bridging the gaps* (1995) , WHO, Geneva.

39. Veronesi, M., Villani, M., Wilsher, S., Contri, A. et Carluccio, A. (2010) A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and Thoroughbred. *Theriogenology* **74**, 627-631.

40. Constância, M., Angiolini, E., Sandovici, I., Smith, P., Smith, R., Kelsey, G., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Sibley, C.P., Reik, W. et 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. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365304. Consulté le juin 6, 2017.

41. Bacon, B., Gilbert, R. et Longo, L. (1986) Regional Anatomy of the Term Human Placenta. *Placenta* **7**, 233-241.

42. Boyd, P., Brown, R. et Stewart, W. (1980) Quantitative Structural Differences Within the Normal Term Human Placenta: A Pilot Study. *Placenta* **1**, 337-344.

43. Schuhmann, R. et Wynn, R. (1980) Regional Ultrastructural Differences in Placental Villi in Cotyledons of a Mature Human Placenta. *Placenta* **1**, 345-353.

44. Wyatt, S., Kraus, F., Roh, C.-R., Elchalal, U., Nelson, D. et Sadovsky, Y. (2005) The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta. *Placenta* **26**, 372-379.

45. Sferruzzi-Perri, A., Vaughan, O., Haro, M., Cooper, W., Musial, B., Charalambous, M., Pestana, D., Ayyar, S., Ferguson-Smith, A., Burton, G., Constancia, M. et Fowden, A. (2013) An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. *FASEB J.* **27**, 3928-3937.

46. Fowden, A., Ward, J., Wooding, F., Forhead, A. et Constancia, M. (2006)

513 Programming placental nutrient transport capacity. *J. Physiol.* **572**, 5-15.
514 47. Gicquel, C. et Bouc, Y. Le (2006) Hormonal Regulation of Fetal Growth. *Horm. Res.*
515 *Paediatr.* **65**, 28-33. https://doi.org/10.1159/000091503.
516 48. Fowden, a L., Taylor, P.M., White, K.L. et Forhead, a J. (2000) Ontogenic and
517 nutritionally induced changes in fetal metabolism in the horse. *J. Physiol.* **528**,
518 209-219. http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.2000.00209.x. Consulté le février
519 13, 2017.
520 49. Fowden, A. (2010) Comparative aspects of fetal carbohydrate metabolism. *Equine*
521 *Vet. J.* **29**, 19-25. http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05074.x. Consulté
522 le février 13, 2017.
523 50. Wooding, F., Morgan, G., Fowden, A. et Allen, W. (2000) Separate Sites and
524 Mechanisms for Placental Transport of Calcium, Iron and Glucose in the Equine
525 Placenta. *Placenta* **21**, 635-645.
526 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400400905502. Consulté le mars 15,
527 2017.
528 51. Avagliano, L., Garò, C. et Marconi, A.-M. (2012) Placental amino acids transport in
529 intrauterine growth restriction. *J. Pregnancy* **2012**, 972562.
530 52. Fowden, A. (2003) The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta*
531 **24**, 803-812.
532 53. Lanci, A., Mariella, J., Merlo, B., Castagnetti, C. et Iacono, E. (2017) Preliminary
533 descriptive study of equine placenta generated after transfer of in vivo and in vitro
534 produced embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **29**, 156.
535 54. Peugnet, P., Robles, M., Mendoza, L., Wimel, L., Dubois, C., Dahirel, M., Guillaume,
536 D., Camous, S., Berthelot, V., Toquet, M.-P., Richard, E., Sandersen, C., Chaffaux, S.,
537 Lejeune, J.-P., Tarrade, A., Serteyn, D. et Chavatte-Palmer, P. (2015) Effects of
538 moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and
539 osteoarticular status of pre- weaning horses. *PLoS One* **10**, e0122596.
540 55. Wilsher, S. et Allen, W. (2006) Effects of a Streptococcus equi infection--mediated

nutritional insult during mid-gestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. *Equine Vet. J.* **38**, 549-557.

56. Thorson, J., Karren, B., Bauer, M., Cavinder, C., Coverdale, J. et Hammer, C. (2010) Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: Foaling data. *J. Anim. Sci.* **88**, 982-990.

57. Robles, M., Peugnet, P., Dubois, C., Wimel, L., Guillaume, D., Camous, S., Serteyn, D., Tarrade, A. et Chavatte-Palmer, P. (2015) Effects of maternal nutrition in late-pregnancy on placental structure and function and the neonatal foal's response to glucose. In: *European Equine Health & Nutrition Congress 7th Edition*, European Equine Health & Nutrition Congress, Bruges. p 142-143.

58. Banach, M. et Evans, J. (1981) Effects of inadequate energy during gestation and lactation on the estrous cycle and conception rates of mares and on their foal weights. In: *Proceedings of the Equine Nutrition Physiology and Society Symposium, 7th edition*, Equine Nutrition and Physiology Society, Warrenton. p 97-100.

59. Wilsher, S. et Allen, W. (2003) The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Vet. J.* **35**, 476-83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875326.

60. Elliott, C., Morton, J. et Chopin, J. (2009) Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology* **71**, 683-689.

Figure 1. Establishment of control pregnancies by artificial insemination and of experimental pregnancies by embryo transfer

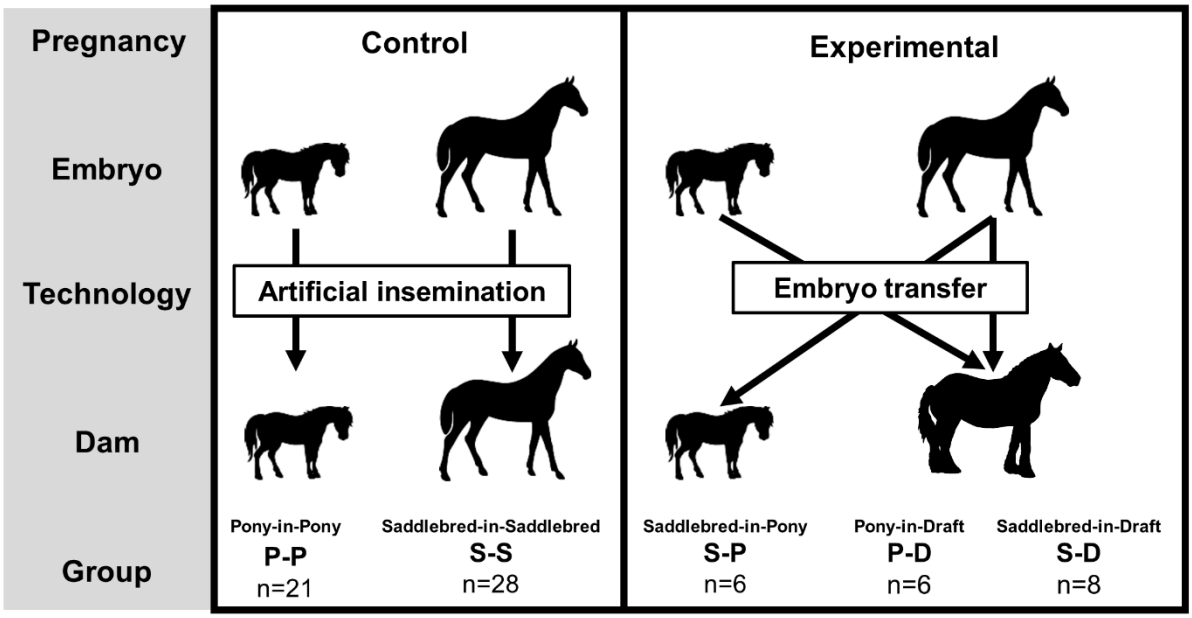


Figure 2. Measurement of the gross placental surface area.
A transparent plexiglas sheet marked with 10cmx10cm squares was applied above the placenta

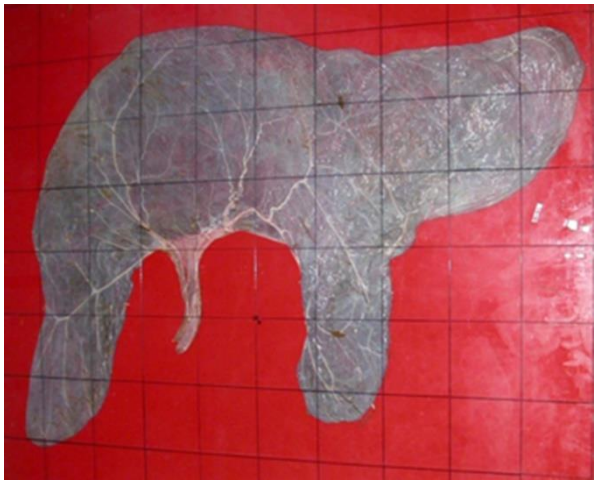


Figure 3: Structure of the horse placenta at term. AC: Allantoic connective tissue, AV: Allantoic vessel, HT : Histotrophic trophoblast.

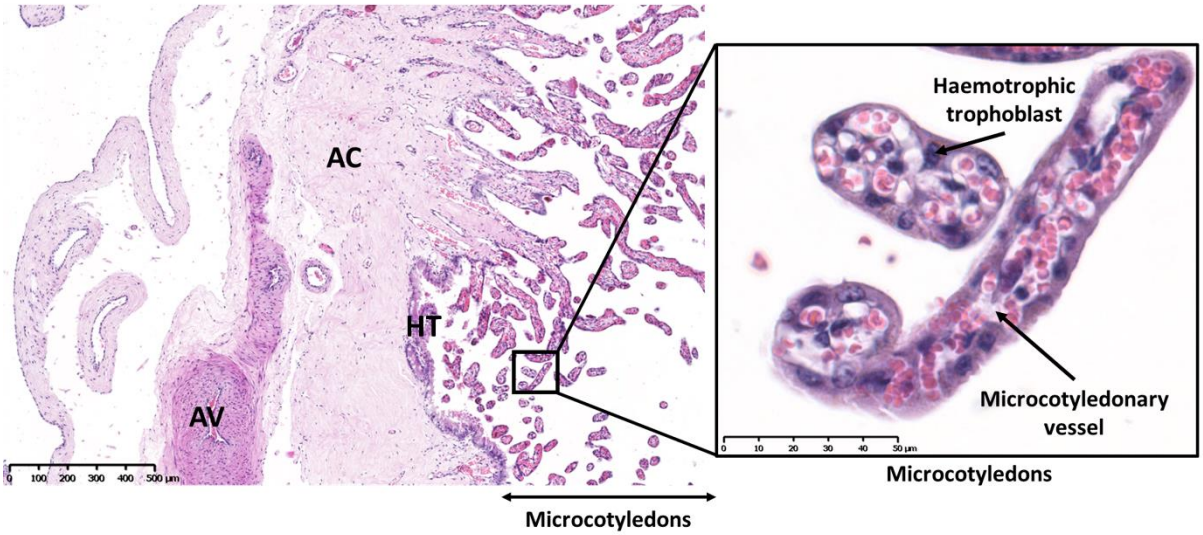


Figure 4. Foal birth weight (A), TFM weight at term (B), placental surface area at term (C) and foal birth weight to TFM weight ratio (D). P-P (n=21): Pony-in-Pony; P-D (n=6): Pony-in-Draft; S-P (n=6): Saddlebred-in-Pony; S-S (n=28): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (n=8): Saddlebred-in-Draft. Different letters indicate p-value<0.05

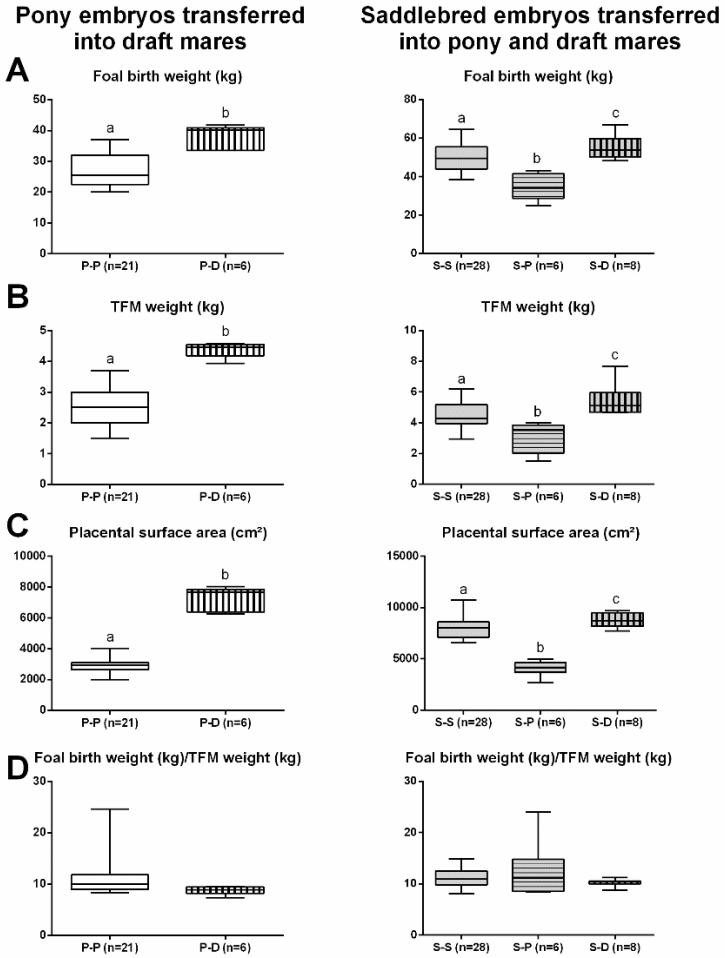


Figure 5. Results of stereological measurements for surface density and volume fraction of the different components of the placenta. The graphs present the surface density of the trophoblast between control and pony transferred in draft groups (A), the surface density (B) and volume fraction (C) of microcotyledonary vessels between saddlebred groups, the surface density of allantoic vessels (D), of trophoblasts (E) and of microcotyledons (F) between saddlebred groups. P-P (n=19): Pony-in-Pony; P-D (n=6): Pony-in-Draft; S-P (n=6): Saddlebred-in-Pony; S-S (n=28): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (n=8): Saddlebred-in-Draft. Different letters indicate p-value<0.05.

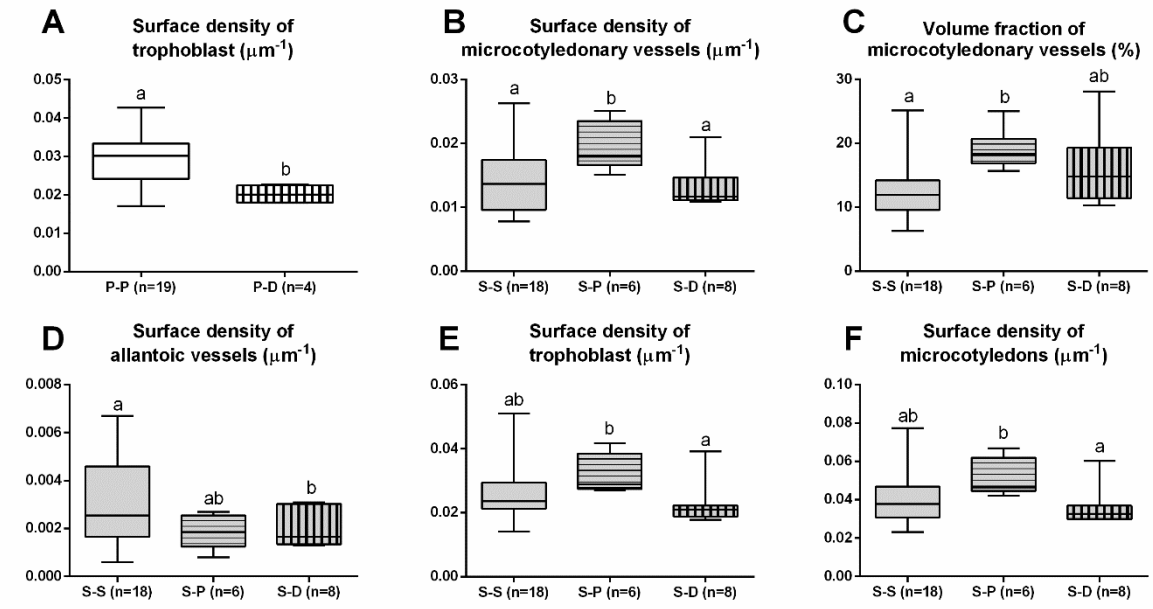
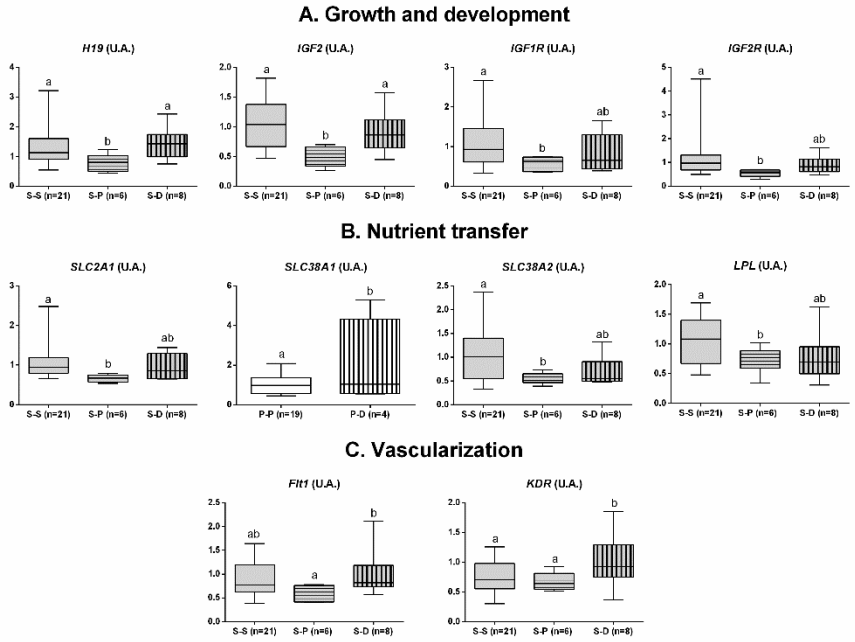
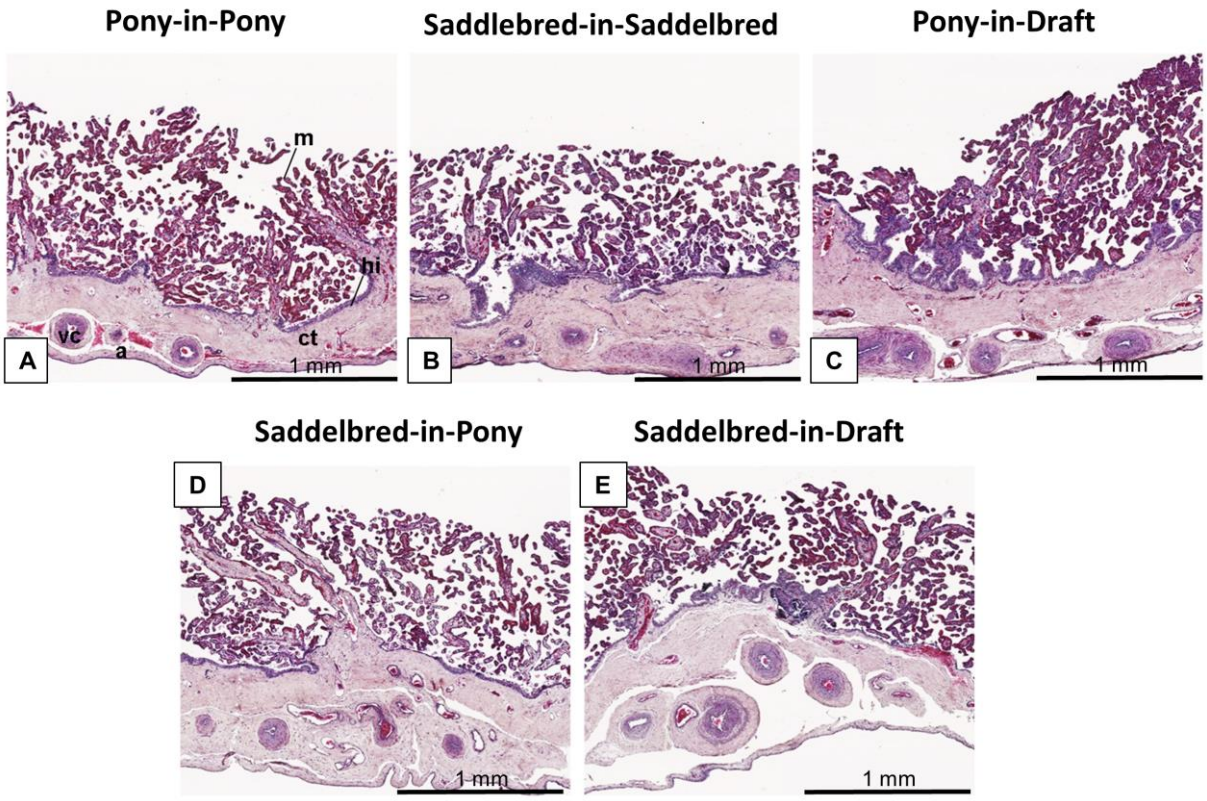


Figure 6. Calibrated normalized relative quantity (arbitrary unit) for differentially expressed genes between groups. The graphs present the genes involved in growth and development (A), nutrient transfer (B) and vascularisation (C). P-P (n=19): Pony-in-Pony; P-D (n=4): Pony-in-Draft; S-P (n=6): Saddlebred-in-Pony; S-S (n=21): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (n=8): Saddlebred-in-Draft. Different letters indicate p-value<0.05.



Supplementary Figure 1. Histological sections of term allantochorion within the 6 groups. P-P (A): Pony-in-Pony; P-D (D): Pony-in-Draft; S-P (E): Saddlebred-in-Pony; S-S (B): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (F): Saddlebred-in-Draft; D-D (C): Draft-in-Draft. The allantois (a) and the connective tissue (ct) with its fetal vessels (vc) are positioned below the histotrophic trophoblast (hi) and the microcotyledons (m), composed of the haemotrophic trophoblast and fetal vessels. Haematoxylin/eosin staining.



Supplementary Table 1. Nutritional value of the diets on farms 1 and 2. DM: dry matter, HFU: horse feed unit (1 HFU=2250 kcal), HDCP: horse digestible crude protein.

FARM 1 IN NOUZILLY					
PREGNANT PONY MARES	**DM (kg)**	**HFU**	**HDCP (g)**	**DM/HFU**	**HDCP/HFU**
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational months 5 to 8	5,23	2,3	158,51	2,28	69,16
Gestational month 9	5,30	2,9	208,00	1,83	71,72
Gestational month 10	4,50	2,8	169,22	1,58	59,48
Gestational month 11	4,50	2,8	169,00	1,61	60,36

FARM 2 IN CHAMBERET					
PREGNANT SADDLEBRED MARES	**DM (kg)**	**HFU**	**HDCP (g)**	**DM/HFU**	**HDCP/HFU**
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	8,29	5,9	344,5	1,42	58,89
Gestational month 6	9,70	7,3	448,0	1,33	61,37
Gestational month 7	9,80	8,3	497,0	1,18	59,88
Gestational month 8	9,10	7,3	463,6	1,24	63,23
Gestational months 9 and 10	9,50	7,1	601,0	1,34	84,65
Gestational month 11	9,1	6,7	540	1,36	80,60
PREGNANT DRAFT MARES	**DM (kg)**	**HFU**	**HDCP (g)**	**DM/HFU**	**HDCP/HFU**
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	7,60	5,8	440,00	1,31	75,86
Gestational month 6	9,00	7,1	446,50	1,28	63,33
Gestational month 7	9,80	8,3	497,00	1,18	59,88
Gestational month 8	9,60	7,3	456,00	1,32	62,47
Gestational months 9 and 10	8,60	8,4	732,00	1,02	87,14
Gestational month 11	10,6	8,5	622	1,25	73,14

Supplementary Table 2. Statistically significant (p<0.05) co-factors added in the linear model. Results are presented as median [quartile 1 – quartile 3].

	Variable	Co-factor	Category	Result	p-value
Parturition	Foals birthweight (kg)	Parity	Primiparous Multiparous	39.2 [28.5 – 49.4] 49.3 [40.0 – 56.9]	<0.001
Biometry	TFM weight (kg)	Parity	Primiparous Multiparous	3.7 [2.9 – 4.5] 4.5 [3.6 – 5.3]	<0.01
	Placental surface area (cm^2)		Primiparous Multiparous	6410.4 [6137.3-8671.0] 7931.2 [3069.4 – 8306.0]	0.047
Morphometry	Surface density of the microcotyledonary vessels (μm^{-1})	Sex	Male Female	0.015 [0.011 – 0.018] 0.017 [0.014 – 0.019]	0.02
	Surface density of the conjunctive tissue (μm^{-1})		Male Female	0.006 [0.005 – 0.007] 0.008 [0.005 – 0.01]	0.02
	Surface density of the allantoic vessels (μm^{-1})		Male Female	0.002 [0.002 – 0.003] 0.003 [0.002 – 0.004]	0.04
Gene expression	*IGF2*	Age	NA	Positive correlation, adjusted r^2: 0.36	0.03
	TGFB1			Positive correlation, adjusted r^2: 0.30	<0.01
	SLC38A1	Parity	Primiparous Multiparous	0.71 [0.56 – 1.20] 1.03 [0.64 – 1.37]	0.03

Article 2 : Placental structure and function in different breeds in horses

Morgane Robles, Pauline Peugnet, Sarah Valentino, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Marie-Christine Aubrière, Francis Reigner, Didier Serteyn, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer.

Soumis à Theriogenology.

Placental structure and function in different breeds in horses

Robles, M.[1*], PM Peugnet[1*], SA Valentino[1], C Dubois[2], M Dahirel[1], M-C Aubrière[1], F Reigner[3], D Serteyn[4], L Wimel[2], A Tarrade[1], P Chavatte-Palmer[1+]

[1]UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Domaine de Vilvert, 78350, Jouy en Josas, France; [2]IFCE, Station Expérimentale, La Valade, 19370, Chamberet, France; [3]INRA UE1297, UEPAO, INRA centre de Tours, 37380, Nouzilly, France; [4]Clinique équine, Faculté de Médecine Vétérinaire, CORD, Université de Liège, Liège, Belgique

* these two authors contributed equally to the publication.

+ corresponding author : pascale.chavatte-palmer@inra.fr

Abstract

Ponies and sometimes draft horses are often used as experimental models for horses although size and metabolic parameters are known to vary between horse breeds. So far, there is little information about differences of placental structure and no information about differences of placental function between breeds. The aim of this study was to investigate differences in placental size, structure and function at birth in relation to foal size and weight in ponies, Saddlebred and draft horses. Pony, Saddlebred and draft horse pregnancies were obtained by artificial insemination over 2 successive breeding seasons. Foals and total fetal membranes (TFM) were weighed and placentas measured for surface area at term. Placentas were sampled above the umbilical cord insertion. Surface density and volume fraction of the different cellular components of the placenta were measured on histological sections using stereology. The expression of genes involved in growth and development, nutrient transfer and vascularization was compared between groups. Foals and TFM were lighter at birth in ponies than Saddlebred horses, and both were lighter compared to draft horses. The surface density and volume fraction of microcotyledonary vessels was increased in pony compared to Saddlebred placentas. The relative expression of genes involved in growth and development was different between breeds and increased with maternal, fetal and placental weight. Primiparous dams produced lighter foals and smaller placentas, associated with a decreased volume fraction of microcotyledonary vessels and genes involved in growth and development and vascularization. Foal sex had little effect on placental structure and function. In conclusion, foal and placental weight, as well as placental expression of genes involved in growth and development were correlated with maternal size. Placental structure also differed between breeds, with a strong difference between ponies and both breeds of horses. These results highlight that the placenta of ponies is not just a miniature version of that of horses and may not serve as a model for larger horses.

Keywords

Horse, placenta, breed, stereology, foal

1. Introduction

In all equidae, placentation is diffuse and epitheliochorial. Haemotrophic exchanges between maternal and fetal blood occur through the placental microcotyledons. The microcotyledons are intense branching structures covered with trophoblast and forming interdigitations with the maternal endometrium to maximize nutrient exchanges. Additionally, histotrophic exchanges take place in-between the microcotyledonary units, across the areolae, in pseudo-stratified trophoblastic cells that are specialized in the transfer of nutrients from the secretions of uterine glands [1–3]. Nevertheless, gestational characteristics differ between horse breeds. Between-breed embryo transfer experiments have demonstrated that foal birth weight is directly related to placental gross surface area, weight and volume and that gross placental development is directly related to the size and breed of the mare [4]. The foal birth weight to maternal body weight ratio also varies from 6.8% in Shire horses to 13.3% in Shetland ponies [5]. Moreover, gestation length has been reported to be longer in Thoroughbred and draft horses compared to ponies [4,6].

So far, differences in placental structure and function between breeds have been poorly explored although microscopic evaluations have revealed that the total fetomaternal contact area is higher in Thoroughbred placentas compared to Welsh pony placentas [4]. Placental development can be affected by maternal metabolism and maternal metabolism also differs between breeds [7,8], with, for instance, a higher incidence of obesity and the metabolic syndrome in ponies compared to other breeds [9]. Moreover, ponies are more insulin resistant than horses [10–12]. Thus, differences in placental structure and function might be expected between breeds. Because placental nutrient transport capacity is dependent on placental size, cellular structure and function [8,13,14], breed related differences in placental function may also be expected.

Here, feto-placental biometry, placental microscopic structure and function (growth and development, nutrient transfer and vascularization) was explored in ponies, Saddlebred and draft horses.

2. Material and Methods

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

The study was conducted over 2 successive breeding seasons (foaling in 2011 and 2012) (Table 1). Pony mares (Welsh ponies, n=27) were born and raised in experimental farm 1 (47°32'36.12"N, 0°44'38.96"E, 120m), where they remained during this experiment. Saddlebred mares (Anglo-Arabian, n=28) were born and raised in experimental farm 2 (45°34'55.17"N, 1°43'16.29"E, 442m) where they remained during this experiment. Draft mares (Breton, n=22) were acquired from local breeders and housed in experimental farm 2 for one year prior to breeding for this experiment. The median age of mares was 7.2 years (range 3-19 years), primiparous and multiparous mares (up to 10 gestations) were used and withers' height was measured for each mare (Table 1). Pregnancies were obtained by artificial insemination (May-August) using semen from one pony (Welsh, n=21 foals), two Saddlebred (Anglo-Arabian, n=28 foals) and one draft (Breton, n=8 foals) stallion.

2.1. Management of mares and placental sampling

From ovulation, mares were kept in pasture with free access to mineral salts. From the 5th gestational month (wintering), mares were housed in boxes and fed a diet based on straw and hay with concentrates in farm 1 and homemade pellets and hay in farm 2, with free access to mineral salts (Supplementary Table 1). Metabolism and body condition of mares during gestation have been previously published [12]. Briefly, pony mares were fat to obese with a mean body condition score (BCS) of 5.0 [4.5–5.0] on a 1-5 scale [15] whereas saddlebred

and draft mares were just above the superior limit for optimal body condition (BCS: 3.75 [3.25–4.0] and 3.75 [3.5–4.0], respectively). BCS remained stable during the 1st 10 months of gestation in all mares and decreased by 0.5 and 0.4 points, respectively, in pony and saddlebred mares in the 11th month of gestation, whereas it remained unchanged in draft mares.

Immediately after delivery, the placenta (allantochorion) was sampled near the umbilical cord: 1 cm² fragments were fixed in 4% formaldehyde for histological analysis and 3mm² fragments were snap-frozen in liquid nitrogen for molecular analysis. The foal and total fetal membranes (placenta + cord and amniotic membrane, TFM) were weighed the next morning. The gross placental surface area was measured by applying a clear Plexiglas sheet marked with 10cmx10cm squares above the placenta (Figure 1) [4]. Placentas were laid in the "F" configuration, revealing both uterine horns and the uterine body. Photographs were taken and the placental surface subsequently measured using the ImageJ® software (National Institute of Health). What corresponded to 10cm in the picture was set as a pixel scale. The placental surface was subsequently measured as double the area calculated by drawing the contour of the placenta on the image.

2.2. Histological and stereological analyses

Placental samples were embedded in paraffin. Sections (7µm) were stained with hematoxylin/eosin and scanned using NanoZoomer Digital Pathology® (Hamamatsu Photonics). Trophoblast, microcotyledonary vessels, microcotyledon (trophoblast + microcotyledonary vessels), allantoic tissue vessels and allantoic connective tissue relative surface (Sv) and relative volume (Vv) were measured using One Stop Stereology (MercatorPro®, ExploraNova, [16]).

As presented in Figure 2, the components measured were: **Microcotyledonary part**: Both the haemotrophic and histotrophic trophoblasts labelled as

124 “trophoblast”, the microcotyledonary vessels and the microscopic area of feto-maternal contact
125 (by adding the measures of the trophoblasts and the microcotyledonary vessels)

126 **Allantoic part**: the allantoic tissue vessels and the allantoic connective tissue.

127 ### *2.3. Gene expression analysis*

128 Total RNA from placental samples was isolated as previously described [17] and purified using
129 the RNeasy® Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse
130 transcription and real time quantitative PCR were performed as previously described [18].
131 Gene-specific primers of gene analysed are shown in Table 2. The expression of the following
132 genes was measured:

133 **Growth and development**: *Insulin-like growth factor 2* (*IGF2)*, a regulator of fetal and
134 placental development, *Insulin-like growth factor 1 receptor* (*IGF1R),* a receptor that modulates
135 IGF-2 action*, Insuline-like growth factor 2 receptor (IGF2R)*, a receptor involved in the
136 signalling pathway of IGF2 degradation, *transforming growth factor β1* (*TGFβ1)*, that regulates
137 cell proliferation and differentiation, *epidermal growth factor receptor* (*EGFR*), that might have
138 a strong influence in microcotyledons maturation [19] and *imprinted maternally expressed*
139 *transcript (non-protein coding)* (*H19)* that encodes a non-coding RNA acting as a negative
140 regulator of cell proliferation.

141 **Nutrient transfer**: *Solute carrier family 2 member 1* (*SLC2A1),* a glucose transporter non-
142 insulin dependent, *Solute carrier family 38 member 1* (*SLC38A1)* and *Solute carrier family 38*
143 *member 2 (SLC38A2)*, two transporters involved in neutral amino acids transfers, *LPL*, a
144 lipoprotein lipase and *cluster of differentiation 36* (*CD36)*, involved in the transfer of
145 phospholipids, lipoproteins and long-chain fatty acids.

146 **Vascularization** *Vascular endothelial growth factor A* (*VEGFA)*, that promotes angiogenesis
147 and vasculogenesis, *vascular endothelial growth factor receptor 1 (FLT1)* and *vascular*
148 *endothelial growth factor receptor 2 (KDR)*, receptors of VEGFA that respectively regulate

149 negatively and positively its action, and *endothelial NOS* (*eNOS)*, an enzyme that catalyses
150 the production of nitric oxide gaseous vasodilator.

151 Data were analyzed using QbasePLUS® (Biogazelle). Calibrated normalized relative quantities
152 (CNRQ) were also calculated as previously described [18]. *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-
153 Phosphate Dehydrogenase), *RPL32* (Ribosomal Protein L32) and *SCAMP3* (Secretory Carrier
154 Membrane Protein 3) [20], as selected by geNorm (https://genorm.cmgg.be), were used as
155 reference genes.

156 ### *2.4. Statistical analysis*

157 Results are expressed as medians [quartile1-quartile3] and presented as boxplots (minimum
158 to maximum). Statistical analyses were performed using R software (www.r-project.org/,
159 version 3.4.0). Data were analyzed using a mixed linear model (*nlme* package) followed by a
160 type 3 ANOVA using the *car* package, considering breed (pony, Saddlebred or draft), parity
161 (primiparous or multiparous) and foal sex (female or male) as fixed effects. Age of the dam
162 was considered as random effect. When the breed effect was statistically significant,
163 differences between breeds were analyzed using a Tukey post-hoc test with the *lsmeans*
164 package. The breeding season effect could not be studied because all draft foals were born
165 during breeding season 2 (2012). Effects were considered significant when p-values were
166 <0.05.
167 Gene expression data were also analyzed using a Principal Component Analysis (PCA) with
168 the *FactoMineR* package in order to qualitatively analyze the importance of differences in gene
169 expression between breeds at term.

170 ## 3. Results

171 ### *3.1. Pregnancies*

172 Pregnancy data are shown in Table 1. Altogether, 21 ponies, 28 Saddlebred and 8 draft foals
173 were delivered spontaneously during spring and summer (range April 17th-July 7th) with >80%

in May/June. Pregnancy length was similar between pony, Saddlebred and draft mares and did not differ according to parity of the dam nor foal sex.

3.2. Foal weight

Birth weights are presented in Figure 3A. Foal sex had no effect on birthweight.

There was a significant effect of breed on birth weight ($p<0.0001$) with pony foals being lighter than Saddlebred (-48.4%, $p<0.0001$) and draft foals (-59.8%, $p<0.0001$). Saddlebred foals were also lighter than draft foals (-22.2%, $p<0.0001$).

Foals born to primiparous dams were lighter than foals born to multiparous dams (-72%, $p<0.0001$).

3.3. Placental biometry and morphometry

3.3.1. Biometry

For biometry, TFM weight, foal/TFM weight ratio, placental surface area and foal birth weight/placental surface area ratio are presented in Figures 3B, 3C and 3D, respectively. None of the fetal membrane measurements differed depending on foal sex.

Fetal membranes weight and surface area differed significantly according to breed ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectively). Fetal membranes were lighter and placental surface area smaller in pony compared to Saddlebred ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectively) and draft ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectively) groups. The placental surface area was reduced in Saddlebred *vs* draft ($p<0.01$) but there was no difference for TFM weight. The foal/TFM weight ratio was not different between breeds. In contrast, foal birth weight/placental surface area ratio differed according to the breed ($p<0.0001$). Indeed, foal mass per cm^2 of placenta (used as a proxy for placental efficiency) was increased in ponies compared Saddlebred ($p<0.0001$) and draft ($p<0.001$) mares. No difference was observed between Saddlebred and draft groups.

Primiparous mares produced lighter TFM ($p=0.01$) and tended to produce smaller placentas ($p=0.058$) than multiparous mares without differences in the foal/TFM weight ratio nor in the foal birth weight/placental surface area ratio.

3.3.2. Morphometry

In terms of histology, no gross or histologic differenced were observed between controls and experimental groups on histological sections. Only the parameters that differed within breeds are presented in Figure 4.

In the microcotyledonary section, the relative surface density and volume fraction of microcotyledonary vessels differed significantly between breeds ($p=0.04$, $p=0.03$, respectively), as the relative surface density and volume fraction of microcotyledonary vessels was higher in pony *vs* Saddlebred placentas ($p=0.04$, $p=0.03$, respectively). No difference in relative surface density and volume fraction was observed between breeds for the trophoblast nor for the microscopic area of feto-maternal contact.

The relative volume fraction of microcotyledonary vessels was reduced in primiparous compared to multiparous placentas ($p=0.01$). No other differences were observed according to parity.

The relative surface density and volume fraction of microcotyledonary vessels was higher in filly than in colt placentas ($p=0.04$, $p<0.0001$, respectively) whereas the relative trophoblastic volume fraction ($p<0.0001$) and microscopic area of feto-maternal contact was higher in male placentas ($p<0.0001$).

In the allantois, relative surface density and volume fraction of the allantoic connective tissue and vessels did not differ between breeds. Nevertheless, the relative volume fraction of the allantoic connective tissue was higher ($p=0.03$) in primiparous than in multiparous placentas. Moreover, the relative surface density of the allantoic connective tissue and vessels was higher in female *vs* male placentas ($p<0.0001$ for both).

3.3.3. Summary

Altogether, these data indicate that no morphometric differences were observed between horse placentas. In contrast, pony placentas appeared to be more efficient than horse placentas with increased microcotyledonary vessel development. Primiparous mares

produced lighter foals, had smaller placentas with less developed microcotyledonary vessels and more allantoic tissue compared to multiparous mares. Finally, placentas were sexually dimorphic with more microcotyledonary and allantoic vessels but less trophoblast and reduced trophoblastic surface in females, resulting in similar placental efficiency between sexes.

3.4. Placental gene expression

The expression of differentially expressed genes is shown in Figure 5 and all calibrated normalized relative quantity (CNRQ) of analysed genes are shown in Supplementary Table 2.

3.4.1. Growth and development

The expression of *IGF2* ($p<0.001$), *IGF1R* ($p=0.03$), *IGF2R* ($p=0.04$) and *TGFβ1* ($p<0.001$) differed according to breed. *IGF2* expression was reduced in pony ($p<0.001$) compared to draft placentas. *IGF1R* and *IGF2R expression* was/tended to be reduced in pony compared to Saddlebred placentas (fold-change: 0.63, $p=0.03$, fold-change: 0.64, $p=0.07$, respectively). The expression of *TGFB1* was reduced in pony and draft compared to Saddlebred placentas (fold-change: 0.35, $p<0.01$, fold-change: 0.87, $p<0.01$, respectively).

The expression of *IGF2* was reduced in Saddlebred compared to draft placentas (fold-change: 0.74, $p=0.046$).

The expression of *H19* and *EGFR* remained unchanged between groups.

The expression of *IGF1R* (fold-change: 0.70, $p<0.01$), *TGFβ1* (fold-change: 0.52, $p=0.02$) and *EGFR* (fold-change: 0.66, $p<0.0001$) was reduced in primiparous compared to multiparous placentas.

The expression of *EGFR* was reduced in female compared to male placentas (fold-change: 0.82, $p<0.0001$).

3.4.2. Nutrient transfer

The expression of *SLC2A1* ($p=0.02$) and *LPL* ($p<0.01$) differed according to breed.

SLC2A1 and *LPL* expression were reduced in pony *vs* Saddlebred placentas (fold-change: 0.73, p=0.02, and fold-change: 0.61, p<0.01, respectively) whereas *SLC38A1*, *SLC38A2* and *CD36* expression were not different between groups.

The expression of genes involved in nutrient transfer did not differ depending on parity nor foal sex.

3.4.3. Vascularization

The expression of *FLT1* (p=0.01) and *KDR* (p<0.0001) was different between breeds. *FLT1* and *KDR* expression were reduced in pony compared to draft placentas (fold-change: 0.60, p=0.01, fold-change: 0.54, p<0.0001) and *KDR* expression only was reduced in Saddlebred *vs* draft placentas (fold-change: 0.72, p<0.0001). *VEGFA* and *eNOS* expression did not differ between groups.

Expression of VEGFA was reduced in placentas of primiparous dams compared with placentas of multiparous dams. No effect of foal sex was observed.

3.4.4. PCA analyses and summary of gene expression data

Gene expression was very similar in Saddlebred and draft placentas (with only differences in *IGF2* and *TGFβ1* expression) whereas pony placentas differed more widely from the two other groups. The main differences between breeds were due to genes involved in growth and development and in vascularization. Indeed, the first dimension of the PCA (explaining 32.72% of the variability) separated pony from Saddlebred and draft placentas according to the expression of genes involved in growth and development (*IGF2, IGF1R, IGF2R, TGFβ1*) and according to the expression of *eNOS* (Figure 6 A and B).

Primiparous mares had reduced expression of some genes involved in growth and development and vascularization. Very little sexual dimorphism was observed for gene expression.

4. Discussion

In the present study, strong breed specificities were observed in foals and placentas at birth. Pony and Saddlebred foals and placentas were lighter at birth than draft foals and placentas. Pony foals and placentas were also lighter at birth than Saddlebred foals and placentas. These differences were associated with a large decrease in the expression of genes involved in growth and development in the placentas of pony whereas Saddlebred only differed from draft placentas through their reduced *IGF2* and *TGFβ1* expression. The expression of genes involved in nutrient transfer was also decreased in pony compared to Saddlebred placentas. Finally, the expression of *FLT1* and *KDR*, involved in vascularization, were increased in draft compared to pony and Saddlebred placentas, despite very few histological differences between breeds.

Although shorter pregnancies were previously reported in ponies [13,27], no breed effect was observed in the present study. Gestation length, however, is not correlated to body size [21] and may be influenced by numerous factors such as foal sex, month of birth and year of breeding (climate, photoperiod), age, nutritional state and parity of the mare [22–26]. The interaction between all these factors and the small number of animals may therefore explain the absence of difference in gestational length between breeds.

As observed previously, birthweight was positively correlated with maternal size [19,27]. Moreover, TFM weight and placental surface area increased with breed size, although TFM weight was similar between both largest breeds. Thus, either the placentas from draft mares were thinner than the Saddlebred placentas or amniotic membranes were lighter in draft mares. This lack of information might explain why there was no difference in the foal/TFM weight ratio while pony placentas were more efficient, according to their surface area, than Saddlebred and Draft placentas. Ponies seem then to have a more efficient placenta than Saddlebred horses.

In contrast to previous data in ponies and Thoroughbreds [4,28], the relative surface density and volume fraction of microcotyledonary vessels was higher in ponies than in Saddlebreds

without any difference in the microscopic area of feto-maternal contact surface density and volume fraction. In agreement with the present study, in pigs, where placentation is also diffuse and epitheliochorial, placental vascular density is higher in the smaller Meishan compared to the larger European Yorkshire breed [29]. The contrasting results in comparison to those of Allen et *al*., 2002 may be due to the use of different methods for placental sampling. In the present study, only the structure of the placenta above the umbilical cord insertion was analysed whereas several areas were analysed by Allen *et al*., 2002. Indeed, it has recently been shown in the horse that the volume of placental villi, haemotrophic trophoblast and microcotyledonary vessels was increased in the body of the placenta compared to the pregnant and non-pregnant horns [30]. Moreover, when comparing the placental structure between primiparous and multiparous mares, the authors observed that the structural differences occurred mainly in the uterine body [30]. Thus, studying only the structure of the placenta above the umbilical cord insertion may not be representative of the entire placenta. Nevertheless, due to its higher volume of villi, haemotrophic trophoblast and microcotyledonary vessels [30], this placental macrocompartment might be the most capable to react to its environment. Another difference between the present work and that of Allen *et al*. is that we added the histotrophic trophoblast to the measurement of the microscopic area of feto-maternal contact while Allen *et al*. only considered the microcotyledons. The surface density and/or volume fraction of the histotrophic trophoblast may be different between breeds and influence the results. Finally, the increased development of microcotyledonary vessels in pony placentas could be responsible for the increased foal birth weight/placental surface area indicating an increased efficiency compared to Saddlebred placentas.

The general level of expression of the genes analysed here increased with breed size. As for placental efficiency and stereological results, ponies seemed to have distinct placental characteristics, the PCA analysis being unable to discriminate between Saddlebred from draft placental function.

Expression of growth factors and their receptors was down-regulated in pony compared to Saddlebred or draft placentas and in Saddlebred compared to draft placentas. These results are consistent with breed size as the expression of *IGF2* is known to be correlated with fetal growth [31]. Similarly, the gene expression of transporters and enzymes involved in nutrient exchanges, previously shown in other species to be affected by IGF2 [14], was reduced in pony compared to Saddlebred placentas. In pigs, comparisons between Asian and European breeds also demonstrated differences in placental expression of genes involved in key metabolic pathways, which could also be related to different feto-maternal metabolisms [32,33]. The physiological consequences of these differences in gene expression remain to be demonstrated as the reduced gene expression of both VEGF receptors (FLT1 and KDR) in pony *vs* draft placentas was not associated with changes in placental vascularisation, nor was the increase in placental vascularisation in pony *vs* Saddlebred placentas associated with changes in gene expression of angiogenic factors. In the human placenta, however, FLT1 and KDR play a role mainly in the beginning of pregnancy (during vasculogenesis and angiogenesis) whereas establishment and maintenance of vessel walls are regulated by other factors such as ANG1, TIE2 and ANG2 [34] that could not be analysed here. This inadequacy between structural and functional results might be explained by the fact that while functional results directly reflect placental status at the time of delivery, the placental structure observed at term results from months of development and maybe from functional changes that occurred earlier in the gestation.

Ponies are more insulin resistant than horses and are more prone to develop metabolic diseases such as laminitis of metabolic syndrome [9–12] whereas Saddlebred and draft mares share a similar metabolism [12]. It is possible that, in addition to maternal size, these differences in maternal metabolism between ponies and horses affect both the placental and foal development. This would explain why the pony placentas were so different of the Saddlebred and draft placentas.

As shown previously, independently of the breed, primiparous mares produced lighter foals, lighter TFM and smaller placentas at term [30,35–38]. These results confirm the hypothesis that primiparous dams might be unable to provide an appropriate uterine and/or metabolic environment for an optimal placental development [30,35], maybe due to the observed decreased volume fraction of microcotyledonary vessels and reduced placental expression of genes involved in growth and development and vascularization.

Finally, despite no sex-related difference in feto-placental biometry, as observed previously, [36], sexual dimorphism was observed in placental structure with increased development of microcotyledonary vessels in females and higher feto-maternal contact area in males. EGF has been proposed to stimulate villi development during gestation [19] and the increased feto-maternal contact in males may be related to the observed increase in EGFR expression. If the differences of placental structure were not associated with feto-placental biometry nor indices used to estimate the placental efficiency, they might affect subsequent foal metabolism and explain differences observed between male and females during growth [39].

Finally, the main limitation of this study is that ponies were not housed in the same farm as Saddlebred and draft mares. Nevertheless, they were all housed in France (separated from 300km), fed concentrates and hay in late gestation and mares' body weight and body condition remained constant throughout gestation [12]. Data from our own laboratory as well as others indicate that only severe differences in maternal nutrition seem to affect foal birthweight and placental size [40–44]. Thus, it may be considered that the effects of the different location may be negligible compared to effects due to differences in maternal breed.

5. Conclusion

In this study, placental and foal measurements, as well as the placental expression of genes involved in growth and development at birth were associated with maternal size. The expression of genes involved in nutrient transfer was reduced in pony compared to Saddlebred placentas. These results demonstrate that placental structure and function vary between

breeds and that draft horses and especially ponies may not be reliably used as models for fetal and placental development of horses.

Acknowledgements: This work was funded through a grant from the Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) under the grant name ''FOETALIM'' and through funding from INRA Department of Physiology and Breeding Systems. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors are grateful to Joseph Bellonie, Philippe Barrière, Thierry Gascogne, Thierry Blard, Yvan Gaudé and François Stieau for care and management of the mares and foals.

6. Bibliography

1. Allen, W. (2001) Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* **121**, 513–527.

2. Steven, D. and Samuel, C. (1975) Anatomy of the placental barrier in the mare. *J. Reprod. Fertil.* **23**, 579–82.

3. Macdonald, A., Chavatte, P. and Fowden, A. (2000) Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (Equus caballus) in the latter half of gestation. *Placenta* **21**, 565–574.

4. Allen, W., Wilsher, S., Turnbull, C., Stewart, F., Ousey, J., Rossdale, P. and Fowden, A. (2002) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* **172**, 445–453. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882022. Accessed February 19, 2017.

5. Platt, H. (1984) Growth of the equine foetus. *Equine Vet. J.* **16**, 247–252.

6. Bos, H. and Mey, G. van der (1980) Length of gestation periods of horses and ponies belonging to different breeds. *Livest. Prod. Sci.* **7**, 181–187.

7. Howell, K. and Powell, T. (2017) Effects of maternal obesity on placental function and

fetal development. *Reproduction* **153**, 97–108.

8. Fowden, A., Sferruzzi-Perri, A., Coan, P., Constancia, M. and Burton, G. (2009) Placental efficiency and adaptation: Endocrine regulation. *J. Physiol.* **587**, 3459–3472.

9. Geor, R. (2008) Metabolic predispositions to laminitis in horses and ponies : obesity , insulin resistance and metabolic syndromes. *J. Equine Vet. Sci.* **28**, 753–759.

10. Bamford, N., Potter, S., Harris, P. and Bailey, S. (2014) Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domest. Anim. Endocrinol.* **47**, 101–107.

11. Jeffcott, L., Field, J., Mclean, J. and O 'dea, K. (1986) Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine Vet. J.* **18**, 97–101.

12. Peugnet, P., Wimel, L., Duchamp, G., Sandersen, C., Camous, S., Guillaume, D., Dahirel, M., Dubois, C., Jouneau, L., Reigner, F., Berthelot, V., Chaffaux, S., Tarrade, A., Serteyn, D. and Chavatte-Palmer, P. (2014) Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Pre-Weaning Horses. *PLoS One* **9**, e102044.

13. Fowden, A.L., Forhead, A.J., Sferruzzi-Perri, A.N., Burton, G.J. and Vaughan, O.R. (2015) Review: Endocrine regulation of placental phenotype. *Placenta* **36**, S50–S59.

14. Fowden, A., Ward, J., Wooding, F., Forhead, A. and Constancia, M. (2006) Programming placental nutrient transport capacity. *J. Physiol.* **572**, 5–15.

15. Arnaud, G., Perret, G., Dubroeucq, H. and Rivot, D. (1997) *Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport - Guide pratique*, Quae., Institut de l'élevage.

16. Reed, M., Howard, C. and Yanés, G. DE (2010) One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers. *J. Microsc.* **239**, 54–65.

17. Chomzynski, P. (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium

Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.

18. Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Aubrière, M.-C., Peynot, N., Dahirel, M., Bertrand-Michel, J., Aguirre-Lavin, T., Morel, O., Beaujean, N., Duranthon, V. and Chavatte-Palmer, P. (2013) Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. *PLoS One* **8**, e83458.

19. Allen, W., Wilsher, S., Turnbull, C., Stewart, F., Ousey, J., Rossdale, P. and Fowden, A. (2002) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* **123**, 445–453. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882022. Accessed February 19, 2017.

20. Brosnahan, M., Miller, D., Adams, M. and Antczak, D. (2012) IL-22 Is Expressed by the Invasive Trophoblast of the Equine (Equus caballus) Chorionic Girdle. *J. Immunol.* **188**, 4181–4187.

21. Heck, L., Clauss, M. and Sánchez-Villagra, M.R. (2017) Gestation length variation in domesticated horses and its relation to breed and body size diversity. *Mamm. Biol. - Zeitschrift für Säugetierkd.* **84**, 44–51. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1616504717300101.

22. Morel, M., Newcombe, J. and Holland, S. (2002) Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. *Anim. Reprod. Sci.* **74**, 175–185.

23. Aoki, T., Yamakawa, K. and Ishii, M. (2013) Factors affecting gestation length in heavy draft mares. *J. Equine Vet. Sci.* **33**, 437–440. http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.07.011.

24. Valera, M., Blesa, F., Santos, R. Dos and Molina, A. (2006) Genetic study of gestation length in andalusian and arabian mares. *Anim. Reprod. Sci.* **95**, 75–96.

25. Satué, K., Felipe, M., Mota, J. and Muñoz, A. (2011) Factors influencing gestational length in mares: A review. *Livest. Sci.* **136**, 287–294.

452 http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2010.09.011.

453 26. Satué, K., Felipe, M., Mota, J. and Muñoz, A. (2011) Gestational length in Carthusian
454 broodmares: effects of breeding season, foal gender, age of mare, year of parturition,
455 parity and sire. *Pol. J. Vet. Sci.* **14**, 173–180.

456 27. Walton, A. and Hammond, J. (1938) The maternal effects on growth and conformation
457 in Shire horse-Shetland pony crosses. *Proc. R. Soc. London* **125**, 311–335.

458 28. Veronesi, M., Villani, M., Wilsher, S., Contri, A. and Carluccio, A. (2010) A
459 comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and
460 Thoroughbred. *Theriogenology* **74**, 627–631.

461 29. Biensen, N., Wilson, M. and Ford, S. (1999) The impacts of uterine environment and
462 fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in
463 pigs. *J. Anim. Sci.* **77**, 954–959.

464 30. Meirelles, M.G., Veras, M.M., Alonso, M.A., Fátima Guimarães, C. de, Nichi, M. and
465 Fernandes, C.B. (2017) Influence of maternal age and parity on placental structure
466 and foal characteristics from birth up to two years of age. *J. Equine Vet. Sci.* .
467 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080616306979.

468 31. Fowden, A. (2003) The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta*
469 **24**, 803–812.

470 32. Hernandez, S., Hogg, C., Billon, Y., Sanchez, M.-P., Bidanel, J.-P., Haley, C.,
471 Archibald, A. and Ashworth, C. (2013) Secreted phosphoprotein 1 expression in
472 endometrium and placental tissues of hyperprolific large white and meishan gilts. *Biol.*
473 *Reprod.* **88**, 120.

474 33. Hong, L., Hou, C., Li, X., Li, C., Zhao, S. and Yu, M. (2014) Expression of heparanase
475 is associated with breed-specific morphological characters of placental folded bilayer
476 between Yorkshire and Meishan pigs. *Biol. Reprod.* **90**, 56.

34. Charnock-Jones, D., Kaufmann, P. and Mayhew, T. (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* **25**, 103–113.

35. Wilsher, S. and Allen, W. (2003) The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Vet. J.* **35**, 476–83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875326.

36. Elliott, C., Morton, J. and Chopin, J. (2009) Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology* **71**, 683–689.

37. Doreau, M., Boulot, S. and Martin-Rosset, W. (1991) Effect of parity and physiological state on intake, milk production and blood parameters in lactating mares differing in body size. *Anim. Prod.* **53**, 111–118. http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0003356100006048.

38. Lawrence, L., DiPietro, J., Ewert, K., Parrett, D., Moser, L. and Powell, D. (1992) Changes in body weight and condition of gestating mares. *J. Equine Vet. Sci.* **12**, 355–358.

39. Fletcher, K., Topliff, D., Cooper, S., Freeman, D. and Geisert, R. (2000) Influence of age and sex on serum osteocalcin concentrations in horses at weaning and during physical conditioning. *J. Equine Vet. Sci.* **20**, 124–126. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080600804712.

40. Peugnet, P., Robles, M., Mendoza, L., Wimel, L., Dubois, C., Dahirel, M., Guillaume, D., Camous, S., Berthelot, V., Toquet, M.-P., Richard, E., Sandersen, C., Chaffaux, S., Lejeune, J.-P., Tarrade, A., Serteyn, D. and Chavatte-Palmer, P. (2015) Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre- weaning horses. *PLoS One* **10**, e0122596.

41. Wilsher, S. and Allen, W. (2006) Effects of a Streptococcus equi infection--mediated

nutritional insult during mid-gestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. *Equine Vet. J.* **38**, 549–557.

42. Thorson, J., Karren, B., Bauer, M., Cavinder, C., Coverdale, J. and Hammer, C. (2010) Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: Foaling data. *J. Anim. Sci.* **88**, 982–990.

43. Robles, M., Peugnet, P., Dubois, C., Wimel, L., Guillaume, D., Camous, S., Serteyn, D., Tarrade, A. and Chavatte-Palmer, P. (2015) Effects of maternal nutrition in late-pregnancy on placental structure and function and the neonatal foal's response to glucose. In: *European Equine Health & Nutrition Congress 7th Edition*, European Equine Health & Nutrition Congress, Bruges. pp 142–143.

44. Banach, M. and Evans, J. (1981) Effects of inadequate energy during gestation and lactation on the estrous cycle and conception rates of mares and on their foal weights. In: *Proceedings of the Equine Nutrition Physiology and Society Symposium, 7th edition*, Equine Nutrition and Physiology Society, Warrenton. pp 97–100.

Table 1. Pregnancies information. Age, withers' height, weight at foaling, gestational length (median [quartile 1-quartile 3]), parity and sex of foals are presented for each group.

	Mares					Pregnancies					
Groups	**Age (years)**	**Withers height (cm)**	**Weight at foaling (kg)**	**% primiparous**	**% multiparous**	**% males**	**% females**	**Foalings - 2011**	**Foalings - 2012**	**Foalings - total**	**Gestation length (days)**
Pony	9.0 [5.1-10.1]	126.5 [121.0-129.5]	356.0 [300.0 – 394.0]	57	43	43%	57%	10	11	21	334 [328 – 340]
Saddlebred	7.2 [4.3-13.0]	159.5 [156.0-163.5]	646.0 [616.6 – 682.4]	32	68	43%	57%	18	10	28	331 [326 – 335]
Draft	5.2 [4.2-5.3]	155.5 [158.0-159.8]	778.2 [734.4 – 819.3]	38	63	62%	38%	0	8	8	333 [323 – 336]

Figure 1: Measurement of the gross placental surface area. A transparent plexiglas sheet marked with 10cmx10cm squares was applied above the placenta.

Figure 2: Structure of the horse placenta at term. AC: Allantoic connective tissue, AV: Allantoic vessel, HT : Histotrophic trophoblast.

Figure 3: Foal birth weight (A), total fetal membranes (TFM) weight at term (B), placental surface area at term (C) and foal birth weight/placental surface area ratio (D). Pony (n=21), Saddlebred horse (n=28), Draft horse (n=8). Different letters indicate p-value<0.05.

Figure 4: Surface density (A) and volume fraction (B) of the placental microcotyledonary vessels in pony (n=19), Saddlebred (n=18) and Draft horse (n=8) placentas.
Different letters indicate p-value<0.05.

Figure 5: Calibrated normalized relative quantity (arbitrary unit) for differentially expressed genes between breeds. The graphs present the genes involved in growth and development (A), nutrient transfer (B) and vascularisation (C). Pony (n=19), Saddlebred horse (n=21), Draft horse (n=8). Different letters indicate p-value<0.05.

Figure 6: PCA analysis of placental gene expression. A. Variables graph. B. Individuals factor map. The increased expression of genes involved in growth and development and of *eNOS* is located on the right side of the variables graph, in the same area where Saddlebred and draft placentas are gathered on the individuals factor map. Conversely, pony placentas are gathered on the left side of the individuals factor map. Pony (n=19), Saddlebred horse (n=21), Draft horse (n=8).

Figure 1

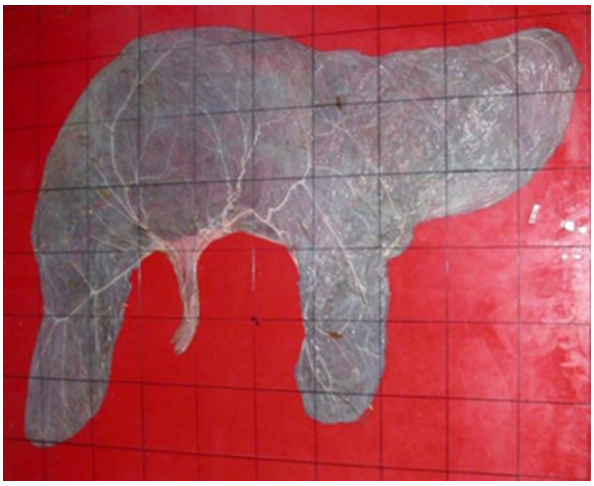


Figure 2

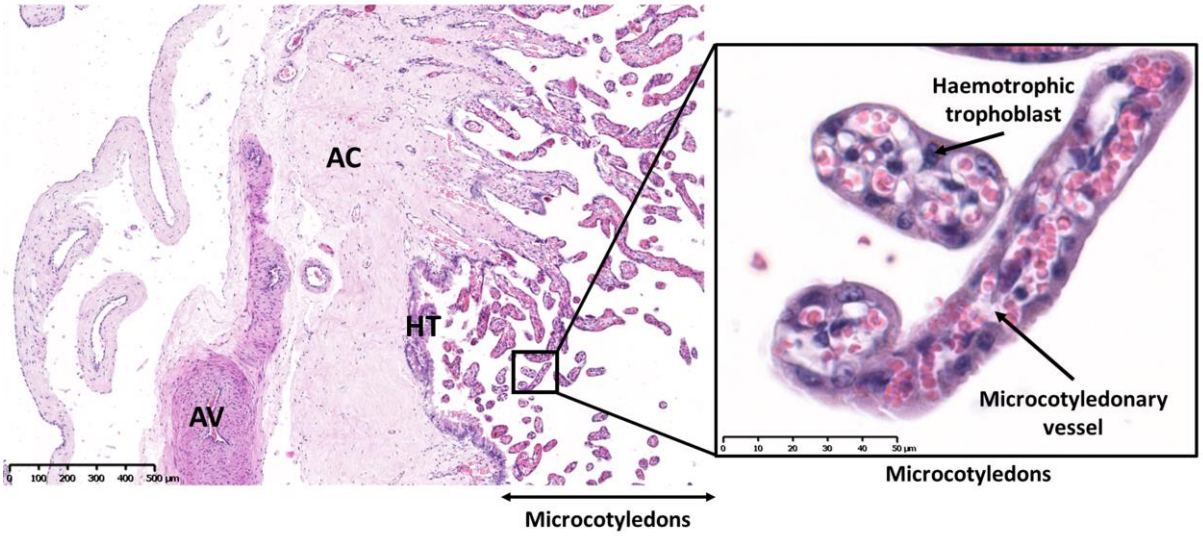


Figure 3

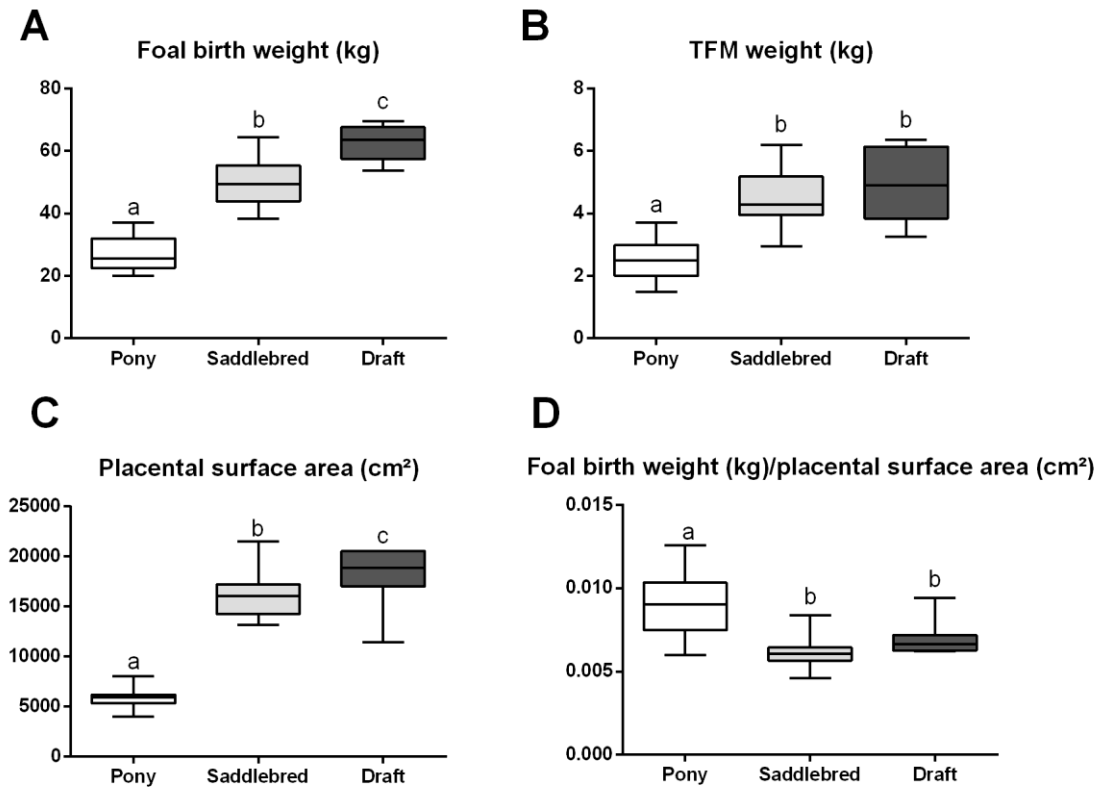


Figure 4

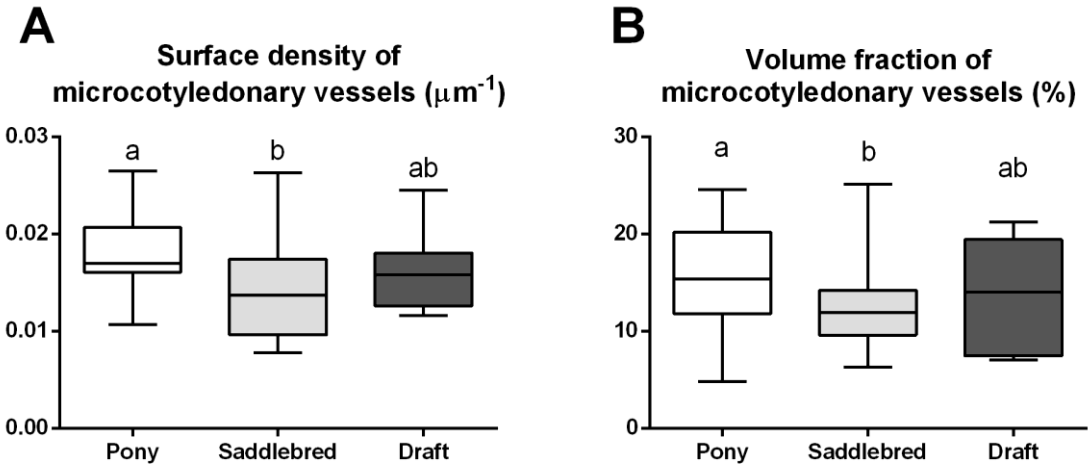


Figure 5

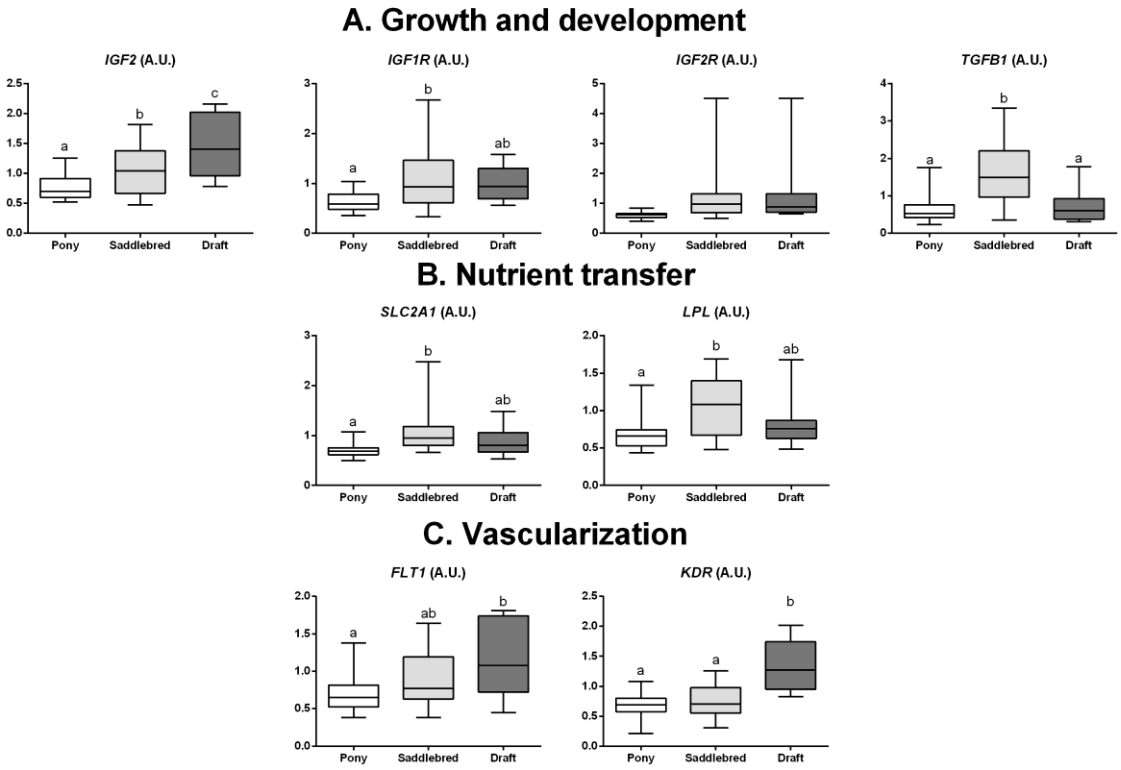
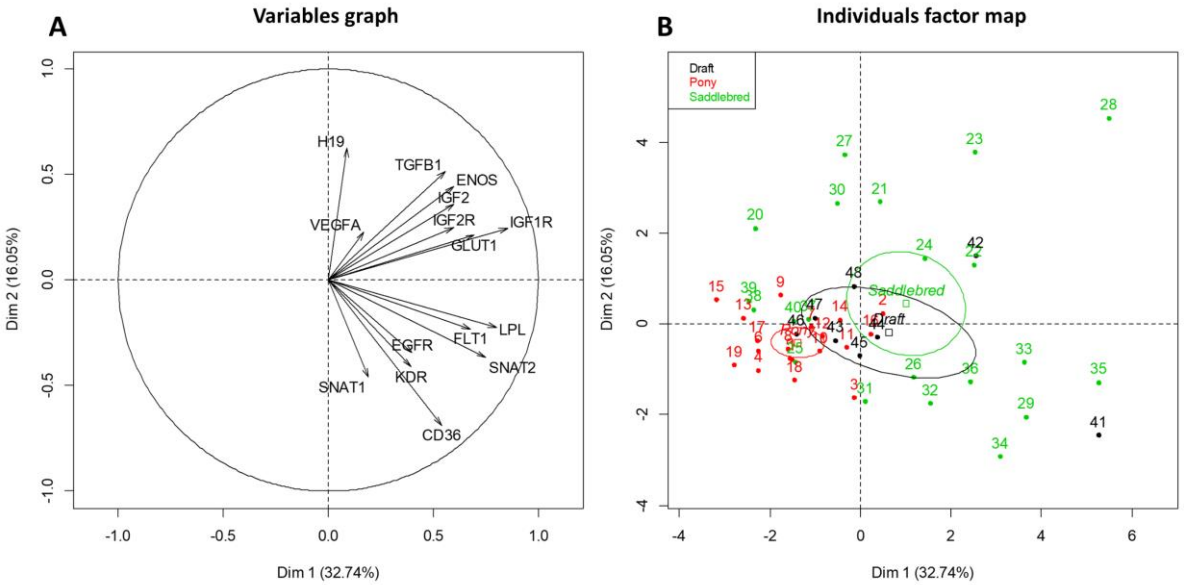


Figure 6



Supplementary Table 1. Nutritional value of the diets given to pregnant mares on farms 1 and 2. DM: dry matter, HFU: horse feed unit (1 HFU = 2250 kcal), MADC: horse digestible crude protein.

FARM 1 IN NOUZILLY					
PONY MARES	**DM (kg)**	**HFU**	**HDCP (g)**	**DM/HFU**	**HDCP/HFU**
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational months 5 to 8	5,23	2,3	158,51	2,28	69,16
Gestational month 9	5,30	2,9	208,00	1,83	71,72
Gestational month 10	4,50	2,8	169,22	1,58	59,48
Gestational month 11	4,50	2,8	169,00	1,61	60,36

FARM 2 IN CHAMBERET					
SADDLEBRED MARES	**DM (kg)**	**HFU**	**HDCP (g)**	**DM/HFU**	**HDCP/HFU**
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	8,29	5,9	344,5	1,42	58,89
Gestational month 6	9,70	7,3	448,0	1,33	61,37
Gestational month 7	9,80	8,3	497,0	1,18	59,88
Gestational month 8	9,10	7,3	463,6	1,24	63,23
Gestational months 9 and 10	9,50	7,1	601,0	1,34	84,65
Gestational month 11	9,1	6,7	540	1,36	80,60
DRAFT MARES	**DM (kg)**	**HFU**	**HDCP (g)**	**DM/HFU**	**HDCP/HFU**
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	7,60	5,8	440,00	1,31	75,86
Gestational month 6	9,00	7,1	446,50	1,28	63,33
Gestational month 7	9,80	8,3	497,00	1,18	59,88
Gestational month 8	9,60	7,3	456,00	1,32	62,47
Gestational months 9 and 10	8,60	8,4	732,00	1,02	87,14
Gestational month 11	10,6	8,5	622	1,25	73,14

.

Supplementary Table 2. Summary of results of gene expression. Calibrated normalized relative quantity (CNRQ) for analysed genes. Data are presented as median [quartile 1 – quartile 3].

		CNRQ		
	Gene	**Pony**	**Saddlebred**	**Draft**
Growth and development	***H19***	1.15 [0.51-1.49]	1.13 [0.91-1.60]	1.11 [0.85-1.56]
	IGF2	0.70 [0.61-0.87]	1.04 [0.67-1.30]	1.40 [0.97-1.79]
	IGF1R	0.59 [0.48-0.78]	0.93 [0.61-1.47]	0.94 [0.69-1.30]
	IGF2R	0.62 [0.54-0.66]	0.97 [0.68-1.31]	0.88 [0.70-1.33]
	TGFB1	0.53 [0.42-0.76]	1.50 [0.96-2.20]	0.61 [0.34-0.93]
	EGFR	1.50 [1.16-1.78]	1.18 [0.76-1.42]	0.66 [0.39-1.12]
Nutrient transfer	***SLC2A1***	0.69 [0.61-0.75]	0.95 [0.80-1.19]	0.80 [0.67-1.06]
	SLC38A1	0.98 [0.57-1.36]	0.70 [0.40-1.10]	0.81 [0.17-1.39]
	SLC38A2	0.58 [0.54-0.66]	1.01 [0.55-1.40]	0.67 [0.64-0.98]
	CD36	0.72 [0.55-0.90]	0.78 [0.47-1.17]	0.72 [0.37-0.89]
	LPL	0.66 [0.53-0.74]	1.08 [0.67-1.40]	0.76 [0.63-0.87]
Vascularization	***VEGFA***	1.22 [0.90-1.40]	1.23 [0.80-1.57]	1.27 [1.09-1.36]
	FLT1	0.65 [0.52-0.81]	0.77 [0.63-1.20]	1.08 [0.72-1.74]
	KDR	0.69 [0.58-0.80]	0.71 [0.55-0.98]	1.27 [0.95-1.75]
	eNOS	0.65 [0.46-0.80]	1.13 [0.75-1.68]	1.29 [0.78-1.85]

Article 3 : Effects of Moderate Amounts of Barley in Late Pregnancy on Growth, Glucose Metabolism and Osteoarticular Status of Pre-Weaning Horses

Pauline Peugnet, **Morgane Robles,** Luis Mendoza, Laurence Wimel, Cédric Dubois, Michèle Dahirel, Daniel Guillaume, Sylvaine Camous, Valérie Berthelot, Marie-Pierre Toquet, Eric Richard, Charlotte Sandersen, Stéphane Chaffaux, Jean-Philippe Lejeune, Anne Tarrade, Didier Serteyn, Pascale Chavatte-Palmer

PLOS One, 2015, 10;4:e0122596
DOI: 10.1371/journal.pone.0122596

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Effects of Moderate Amounts of Barley in Late Pregnancy on Growth, Glucose Metabolism and Osteoarticular Status of Pre-Weaning Horses

Pauline Peugnet[1]*, Morgane Robles[1], Luis Mendoza[6], Laurence Wimel[2], Cédric Dubois[2], Michèle Dahirel[1], Daniel Guillaume[3], Sylvaine Camous[1], Valérie Berthelot[4], Marie-Pierre Toquet[5], Eric Richard[5], Charlotte Sandersen[6], Stéphane Chaffaux[1], Jean-Philippe Lejeune[6], Anne Tarrade[1], Didier Serteyn[6], Pascale Chavatte-Palmer[1]

1 INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350, Jouy en Josas, France, **2** IFCE, Station Expérimentale de la Valade, F-19370, Chamberet, France, **3** INRA, UMR85, Physiologie de la Reproduction et Comportements, CNRS, UMR7247, F-37380, Nouzilly, France, Université François Rabelais de Tours, F-37000, Tours, France, **4** AgroParis Tech, F-75005, Paris, France, **5** Normandie University, UNICAEN, SF4206 ICORE / LABEO Frank Duncombe Laboratory, F-14000, Caen, France, **6** Clinique Equine, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B-4000, Liège, Belgium

* peugnetpauline@gmail.com

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Peugnet P, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, et al. (2015) Effects of Moderate Amounts of Barley in Late Pregnancy on Growth, Glucose Metabolism and Osteoarticular Status of Pre-Weaning Horses. PLoS ONE 10(4): e0122596. doi:10.1371/journal.pone.0122596

Academic Editor: Daniel E Crocker, Sonoma State University, UNITED STATES

Received: October 13, 2014

Accepted: February 11, 2015

Published: April 13, 2015

Copyright: © 2015 Peugnet et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded through a grant from the "Institut Français du Cheval et de l'Equitation" under grant name "FOETALIM" and through funding from the "Institut National de la Recherche Agronomique" Department "Physiology and Breeding Systems". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

In stud management, broodmares are commonly fed concentrates in late pregnancy. This practice, however, was shown to correlate with an increased incidence of osteochondrosis in foals, which may be related to insulin sensitivity. We hypothesized that supplementation of the mare with barley in the last trimester of pregnancy alters the pre-weaning foal growth, glucose metabolism and osteoarticular status. Here, pregnant multiparous saddlebred mares were fed forage only (group F, n=13) or both forage and cracked barley (group B, n=12) from the 7th month of pregnancy until term, as calculated to cover nutritional needs of broodmares. Diets were given in two daily meals. All mares and foals returned to pasture after parturition. Post-natal growth, glucose metabolism and osteoarticular status were investigated in pre-weaning foals. B mares maintained an optimal body condition score (>3.5), whereas that of F mares decreased and remained low (<2.5) up to 3 months of lactation, with a significantly lower bodyweight (-7%) than B mares throughout the last 2 months of pregnancy. B mares had increased plasma glucose and insulin after the first meal and after the second meal to a lesser extent, which was not observed in F mares. B mares also had increased insulin secretion during an intravenous glucose tolerance test (IVGTT). Plasma NEFA and leptin were only temporarily affected by diet in mares during pregnancy or in early lactation. Neonatal B foals had increased serum osteocalcin and slightly increased glucose increments and clearance after glucose injection, but these effects had vanished at weaning. Body measurements, plasma IGF-1, T_4, T_3, NEFA and leptin concentrations, insulin secretion during IVGTT, as well as glucose metabolism rate during euglycemic hyperinsulinemic clamps after weaning, did not differ between groups. Radiographic examination of joints indicated increased osteochondrosis relative risk in B foals, but this was not significant. These

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

data demonstrate that B or F maternal nutrition has very few effects on foal growth, endocrinology and glucose homeostasis until weaning, but may induce cartilage lesions.

Introduction

Epidemiological observations in humans have linked early-life events with a range of degenerative pathologies in adulthood. Individuals with small birth weight are at greater risk of developing coronary heart disease, hypertension, type II diabetes or osteoporosis in later life [1]. Because fetal growth is primarily determined by the nutrient supply, studies of the Developmental Origins of Health and Disease have first focused on maternal undernutrition and nutritional deficiencies. Indeed, individuals who were exposed *in utero* to the Dutch Famine were more susceptible to develop metabolic syndrome in adult life [2]. The concept was extended to all forms of malnutrition, since higher risk to develop diseases as an adult was found in both individuals born small and individuals born large, with a U-shaped curve [3, 4].

Developmental programming of the offspring by maternal nutritional imbalance has been investigated experimentally in mammals using various models aimed at compromising the fetal nutrient supply [5]. In horses, there is a growing body of evidence indicating immediate and long term post-natal consequences of fetal adaptations to intra-uterine *stimuli*. Experimental models of lush *versus* deprived fetal nutrient supply have been obtained by transferring embryos from small breeds (ponies) into mares from large breeds (Thoroughbred, saddlebred and draft mares) and embryos from large breeds into mares from small breeds. Growth patterns were altered up to three years of age [6–8]. Glucose homeostasis, the cardiovascular function, as well as thyroid hormones concentrations, were affected until weaning [8–10].

The effect of maternal nutrition was partly investigated by Ousey and her colleagues: feeding pregnant mares with moderate *versus* high amounts of concentrates throughout pregnancy did not affect birth weight, but enhanced pancreatic beta-cell sensitivity to glucose in newborns born to mares in the moderate group [11]. Besides, feeding pregnant dams with a high starch diet from the 7^{th} month of pregnancy induced a trend towards lower insulin sensitivity in foals at 160 days of age [12]. Recently, an epidemiological study demonstrated that foals born to dams supplemented with concentrates during pregnancy had an increased incidence of osteochondrosis lesions compared to those born to dams that were not supplemented [13].

In practice, broodmares are often fed high energy rations in late pregnancy *i.e.*, at the time of maximal fetal growth, which may have detrimental effects in the newborn but also in the adult horse. The present study investigates the effects of adding a limited amount of carbohydrates-concentrated feed to the diet of broodmares on their foals' post-natal growth, glucose metabolism and joint health. Cracked barley was chosen as a concentrate in order to provide additional energy to mares for the last four months of pregnancy and because it is commonly used in stud management. Foals were monitored from birth to weaning for growth, glucose homeostasis, endocrine factors involved in both growth and energy regulation (Insulin-like Growth Factor-I, IGF-I; thyroid hormones, T_4 and T_3), as well as biomarkers of bone cell activity during growth (osteocalcin; hydroxyproline; C-telopeptide of type II collagen, CTX-II).

Materials and Methods

Animals

Animal studies received ethical approval from the local ethics committee ("Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale du Limousin") under protocol number 5-2013-5.

Table 1. Repartition of broodmares between groups "forage" and "barley" according to age, parity and withers' height (median [quartile 1-quartile 3], minimum and maximum values).

	Group "forage" (n = 13) SF n = 6, AA n = 6, SD n = 1			Group "barley" (n = 12) SF n = 8, AA n = 3, SD n = 1		
	Median [Q1–Q3]	Min	Max	Median [quartile 1-quartile 3]	Min	Max
Parity (number of foals)	3 [2–3]	2	11	3 [2–4]	2	8
Age (years)	9.2 [8.1–10.2]	6.1	21.2	8.6 [6.9–12.8]	6.1	19.1
Withers' height (cm)	162.0 [160.0–165.0]	157.0	170.0	162.5 [160.5–165.0]	156.0	168.0

SF: Selle Français, AA: Anglo-Arab or Anglo-Arabian type, SD: Saddlebred.

doi:10.1371/journal.pone.0122596.t001

Mares and establishment of pregnancies. Twenty-five mares (Selle Français, Anglo-Arab and Saddlebred) were used (median age: 9 years; range 6 to 21). They were raised in the "Institut Français du Cheval et de l'Equitation" experimental farm (Chamberet, France, 45° 34'55.17"N, 1°43'16.29"E, 442 m). All mares were multiparous (median parity: 3; range 2 to 11 foals). Twenty-five pregnancies were obtained by artificial insemination (from May 9th to June 29th) using semen from one saddlebred stallion.

Management and feeding of mares and foals. From ovulation, grazing was available 24 h/day with free access to water and mineral salts. Pregnant mares were managed in one same herd. From November 21st (median gestational day 186; range 145 to 196), they were moved to individual boxes in the same barn. They were fed hay and hay-crop silage (haylage) until December 5th (median gestational day 200, range 159 to 210), when they were allocated to a "forage" (group F, n = 13) or "barley" (group B, n = 12) feeding group, with equal repartition between groups according to age, parity and withers' height (Table 1). Group F was fed hay and haylage, whereas group B was fed hay, haylage and a homemade mix of cracked barley with vitamins and minerals (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, Cholet, France). Group F received vitamins and minerals simultaneously to concentrates distribution in group B. Diets were distributed in two daily meals (8:45 AM and 3:45 PM), with free access to water. Dietary offer was adjusted according to mares' bodyweight at median gestational days 208, 221, 241, 272, 282, 304, 321 and 332, in accordance with current recommendations for broodmares [14]. A different hay batch was used near parturition because the batch used at the start of the experiment was out of stock. The quality of feedstuff was measured (Table 2). The daily quantity of feeds given to mares according to gestational age is shown in Table 3.

All foals were born during spring (from April 8th to June 3rd). Mares and foals returned to grazing 3 days after foaling. Fillies and colts were raised in one group in the same pasture until weaning at 180 days of age by complete, abrupt separation of mares and foals. Foals were then

Table 2. Quality of feedstuff given to broodmares of groups "forage" and "barley" from November (median gestational day 186) to parturition.

	Chemical composition (per kg of dry matter)			Mineral composition (per kg of dry matter)	
	Net energy (Horse feed units)	Horse digestible crude proteins (g)	Raw cellulose (g)	Calcium (g)	Phosphorus (g)
Homemade mix	1.2	127	52.7	12.1	5.8
Haylage	0.6	104	249.0	7.7	3.8
Hay H1	0.5	30	372.0	3.7	2.1
Hay H2	0.6	88	30.8	6.6	3.8
Excel Prima S	NA	NA	NA	375	62.5

doi:10.1371/journal.pone.0122596.t002

Table 3. Daily individual quantities of feeds given to pregnant mares of groups "forage" and "barley" from November (median gestational day 186) to parturition. H1 and H2 indicate when a different hay batch was used.

Median gestational day	Meal	Type of hay	Group "barley"			Group "forage"		
			Hay (kg)	Haylage (kg)	Barley mix (kg)	Hay (kg)	Haylage (kg)	Minerals and vitamins (kg)
186	**8:45 AM**	H1	3	1.5	0	3	1.5	0
	3:45 PM	H1	5	1.5	0	5	1.5	0
200	**8:45 AM**	H1	3	1	1	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	5	1	1	6	1.5	0.028
208	**8:45 AM**	H1	3	1.5	1.5	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	4	1.5	1.5	6	1.5	0.028
221	**8:45 AM**	H1	3	1.5	1.5	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	5	2	1.5	6.5	2	0.028
241	**8:45 AM**	H1	3	2.5	1.5	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	4	2.5	2	6.5	2	0.028
272	**8:45 AM**	H1	3	2.5	1.5	4	2	0.030
	3:45 PM	H1	4	2.5	2	8	2	0.030
282	**8:45 AM**	H1	1	3	1.5	3	2	0.030
	3:45 PM	H1	3	6	2	6.5	5.5	0.030
304	**8:45 AM**	H2	1	3	1.5	3	2	0.030
	3:45 PM	H2	3	6	2	6.5	5.5	0.030
321	**8:45 AM**	H2	1	3	1.5	3	3	0.035
	3:45 PM	H2	3	6	2	7	6	0.035
332	**8:45 AM**	H2	1	3	1.5	3	3	0.035
	3:45 PM	H2	3	6	2	7	6	0.035

doi:10.1371/journal.pone.0122596.t003

housed in open barns, fed hay twice a day and supplemented individually (using an automatic concentrates feeder) with homemade pellets containing barley, soybean cake, molasses and vitamins and minerals (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, Cholet, France) in agreement with current recommendations for growing foals [14], with free access to water. The daily nutritional supply to weanlings is given in Table 4. Foals were dewormed at median age 142 days (range 105 to 161).

All mares returned to farm without further experimentation after weaning, whereas foals were kept for further research beyond weaning.

Body measurements and blood sampling in mares and foals. All measurements and sampling were performed without analgesia or anesthesia.

Mares were weighed and their body condition score (BCS—scale 1 to 5 [15]) was estimated by two trained, independent operators monthly during pregnancy, in the 1st day, the 1st, 2nd, 3rd and 6th month of lactation. Jugular vein blood samples were collected in EDTA tubes monthly during pregnancy, in the 1st day, the 1st, 3rd and 6th month of lactation between 9:00

Table 4. Daily nutritional supply to weanlings (6 to 12 months of age).

	Chemical composition (per kg of dry matter)			Mineral composition (per kg of dry matter)	
	Net energy (Horse feed units)	Horse digestible crude proteins (g)	Raw cellulose (g)	Calcium (g)	Phosphorus (g)
Homemade pellet	1.13	102	63.9	7.10	4.90
Hay	0.62	95	315.5	5.85	2.38

doi:10.1371/journal.pone.0122596.t004

AM and 10:00 AM to measure plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA) which reflect the mobilization of body fat in case of energy deficit and leptin which are a proxy for adiposity.

Foals were weighed and measured for withers' height, front leg length, chest circumference, shoulder and hip widths in the morning following birth and then monthly until weaning at 180 days of age. Jugular vein blood samples were collected in EDTA and serum tubes before first suckling, at 3 and 30 days of age after 4 h fasting, at 60 and 90 days of age after 6 h fasting and at 180 days of age after overnight fasting to measure plasma concentrations of IGF-1, T_4 and T_3 which are essential factors of bone longitudinal growth through enchondral ossification, as well as serum concentrations of osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II which are biomarkers of bone and cartilage turn-over. Fasting glucose concentrations were measured at 3, 30, 90, 130, 180 and 210 days of age using an automated analyzer (Medisense Optium Xceed, Abbott, Illinois, USA). Plasma or serum was separated after centrifugation and stored at -20°C.

Glucose metabolism testing in mares and foals

All metabolic tests were performed without analgesia or anesthesia.

Assessment of the daily effect of diet on plasma glucose and insulin. Jugular vein blood samples were collected each hour over a 10-hour period on December 17th (median gestational day 212; range 171 to 223), starting at 8:30 AM and ending at 6:30 PM, for immediate measurement of plasma glucose concentrations using an automated analyzer. Plasma was separated after centrifugation and stored at -20°C.

Intravenous glucose tolerance test (IVGTT) in mares and foals. IVGTT were performed in mares in August (before dietary treatment, at median gestational age 96; range 53 to 107) and in February (after the start of the dietary treatment, at median gestational age 276; range 237 to 286), as well as in foals at median ages 3 and 130 days (range 125 to 138). The procedure and calculations were previously described [8].

Food was withheld from mares the evening before the procedure, whereas foals were muzzled to prevent suckling 4 h (at 3 days of age) and 6 h (at 130 days of age) before the procedure. Animals were intravenously infused with glucose (0.25 g/kg, 30% glucose) over 5 min in mares, 1 min in 3-day old foals and 2 min in 130-day old foals. Jugular vein blood samples were collected in EDTA tubes in mares at -5 min and 5, 7, 9, 12, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min after the injection started, in 3-day old foals at -5 min and 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30 and 60 min after the injection started and in 130-day old foals at -5 min and 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30, 60 and 120 min after the injection started.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp in foals. Hyperinsulinemic euglycemic clamps were performed in foals at median age 210 days (range 202 to 216). The procedure and calculations were previously described [8].

Biochemical analyses

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

Plasma leptin analysis. Plasma leptin concentrations were measured in mares and foals in duplicate with a homologous double-antibody RIA as previously described [8, 16]. The limit of detection was 1.0 ng/ml. The intra-assay coefficient of variation was less than 10%.

Plasma insulin analysis. Plasma insulin concentrations during glucose metabolism tests were measured in duplicate with a double antibody RIA as previously described [8, 16]. The minimum level of detection was 0.1 pg/mL. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.2% and 5.8%, respectively.

Plasma IGF-1, T_4 and T_3 analyses. Plasma IGF-1, T_4 and T_3 concentrations were measured in foals in duplicate with commercial RIA kits (CISbio International, Gif-sur-Yvette, France) as previously described [8, 16]. The minimum levels of detection were 1.0 ng/mL, 2.5 ng/mL and 0.1 ng/mL, respectively for plasma IGF-1, T_4 and T_3. Intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively 3.5% and 6.0% for plasma IGF-1, 4.7% and 8.0% for plasma T_4 and 7.8% and 8.2% for plasma T_3.

Serum osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II analyses. Serum osteocalcin and CTX-II were assayed in foals in simple with commercial ELISA kits (Immunodiagnostic Systems, Paris, France) validated for use in the horse in the Frank Duncombe Departmental Laboratory. Photometric measurements were set at a wavelength of 450 nm. The minimum levels of detection were 0.5 ng/mL and 3.7 pg/mL, respectively for osteocalcin and CTX-II. Intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively 4.0% and 1.8% for osteocalcin and 4.8% and 2.4% for CTX-II. Serum hydroxyproline concentrations were measured in foals in simple with a colorimetric assay as previously described [17, 18]. Photometric measurements were set at a wavelength of 558 nm.

Radiographic evaluation of osteoarticular status in foals

Radiographic examination at median age 218 days (range 183 to 239) was performed according to a previously reported procedure [13]. Foals were sedated using romifidine (0.06 mg/kg intravenous of Sedivet, Boehringher Ingelheim, Belgium) alone or combined with butorphanol (0.02 mg/kg intravenous of Dolorex, Intervet/Schering Plough, Belgium) when needed. Two experimented examiners analyzed individually the digital radiographs, using the method of radiographic interpretation previously described [19]. Foals were classified as OC-positive according to the presence of one or more OC lesions identified by both examiners. OC was diagnosed according to the presence of lesions that were previously described [13, 20].

Statistical analyses

Results are expressed as median [quartile 1—quartile 3] and presented as curves (median and interquartile range IQR) or boxplots (minimum to maximum). All data are showed in S1 to S8 Datasets. Statistical analyses were carried out using R software (www.r-project.org/, version 2.15.2).

In mares, repeated measures were divided in three periods (pregnancy before diet, pregnancy during dietary treatment and lactation) and were analyzed in each period by non-parametric ANOVA using the F1-LD-F1 model of the nparLD function [21], taking into account the diet and time. This analysis compares one factor (= whole-plot factor, in this case, group category) and one repeated factor (= sub-plot factor; in this case, diet category), applied only during a given time period, with repeated measurements for each subject (continuous parameter), as for a two factor ANOVA (one inter and one intra. The R input code is showed in S1 Text. If the dietary effect or diet:time interaction were significant, B and F mares were compared using the Mann-Whitney test at each time point. P-values from the Mann-Whitney tests were adjusted using the FDR (Benjamini-Hochberg) method.

In foals, repeated measures were analyzed using the F2-LD-F1 model of the nparLD function, taking into account the diet, sex and time [21]. This analysis compares two independent factors: group (category forage or barley) and sex (category male or female) with repeated

measurements for each subject (continuous parameter), as for a three factor ANOVA (two inter and one intra). The R input code is showed in S1 Text. If the diet effect, diet:time interaction, sex effect or sex:time interaction were significant, B and F foals, as well as fillies and colts, were compared using the Mann-Whitney test at each time point. P-values from the Mann-Whitney tests were adjusted using the FDR (Benjamini-Hochberg) method. Non-repeated measures were analyzed using the Mann-Whitney test with no adjustment.

Effects were considered significant for p-values<0.05. For repeated measures, p-values in the text are those from the F1-LD-F1 and F2-LD-F1 tests, whereas asterisks in the figures indicate adjusted p-values<0.05 from the Mann-Whitney tests. For non-repeated measures, p-values in the text are those from the Mann-Whitney tests.

Relative risks and odds ratios related to osteochondrosis presence or absence were calculated using MedCalc software (http://www.medcalc.org/, v13.3.3) and analyzed using chi-squared tests. They were considered significant for p-values<0.05.

Results

Nutritional offer to mares

Fig 1 presents the nutritional offer to mares according to gestational age. It differed significantly between both diets for net energy (NE, expressed in horse feed units, $p<0.001$), horse digestible

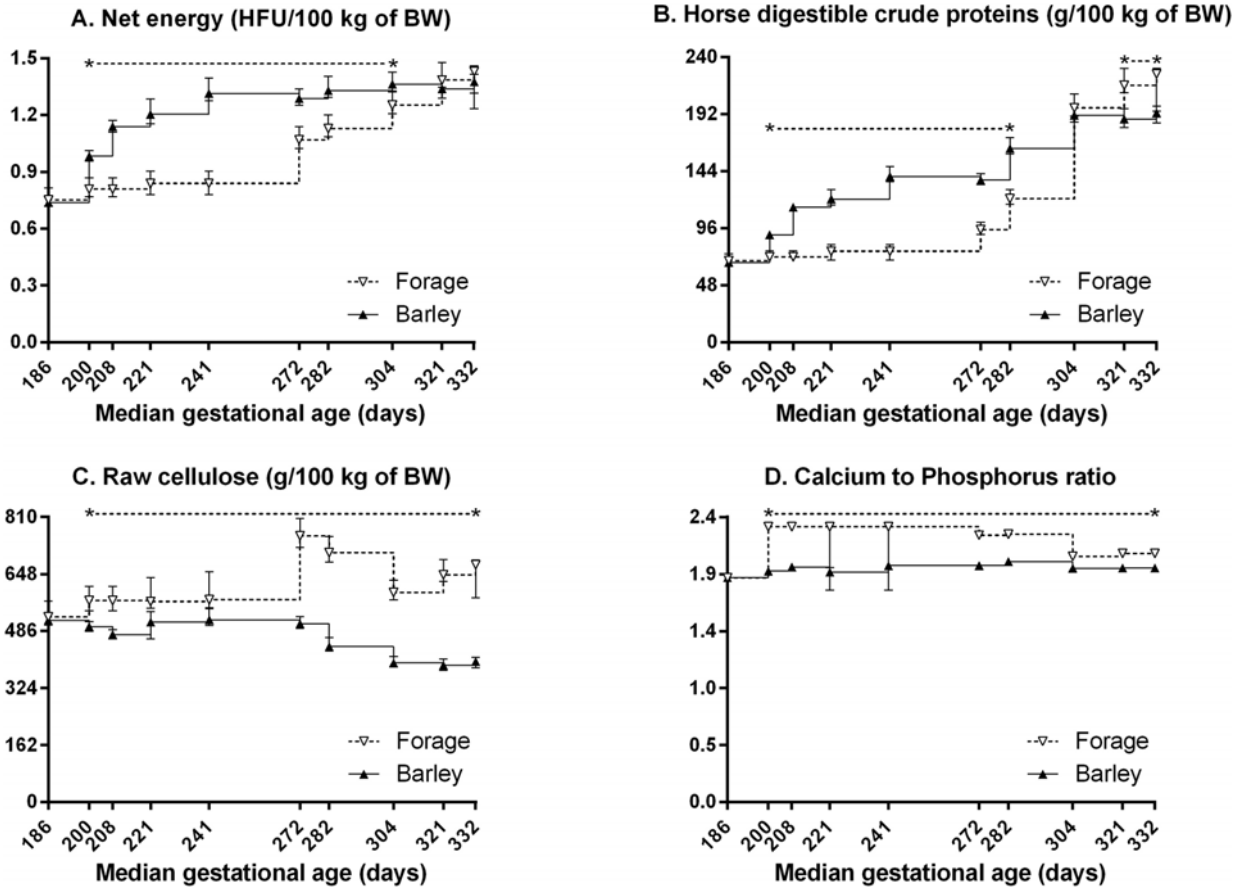


Fig 1. Daily nutritional offer (median and IQR) to broodmares in late pregnancy: net energy (A), horse digestible crude proteins (B), raw cellulose (C), and calcium to phosphorus ratio (D). HFU: horse feed units, BW: bodyweight. Values under the asterisks significantly differ between groups (Mann-Whitney test with FDR adjustment).

doi:10.1371/journal.pone.0122596.g001

crude proteins (HDCP, p = 0.007), raw cellulose (RC, p<0.001) and calcium to phosphorus ratio (Ca/P, p<0.001), with significant diet:time interactions (p<0.001 for the four parameters).

The NE offer was significantly higher in B *versus* F mares from gestational days 200 to 321 and similar between both groups from gestational day 321 to parturition. Diet B provided up to 59.9% more NE than diet F from gestational days 241 to 272.

The HDCP offer was significantly higher in B *versus* F mares from gestational days 200 to 304. It was similar between both groups from gestational days 304 to 321, after which the HDCP supply was significantly lower in B *versus* F mares until parturition. Diet B provided up to 89.2% more HDCP than diet F from gestational days 241 and 272 and up to 14.6% less HDCP than diet F from gestational day 321 to parturition.

The RC and Ca/P offers were significantly lower in B *versus* F mares from gestational days 200 to parturition. Diet B provided up to 39.8% less RC from gestational day 321 to parturition.

Effects of diets in mares

Pregnancy and parturition outcomes. Twenty-five pregnancies were obtained that were allocated to group F (n = 13) and group B (n = 12). All mares delivered spontaneously within the normal pregnancy length (range 331 to 356 days). One B foal with abnormal presentation caused dystocia in the mare and died. Pregnancy data relative to this mare were not discarded from further analysis. Twenty-four healthy foals were obtained (n = 13 in group F; n = 11 in group B): 7 fillies/6 colts in group F and 5 fillies/6 colts in group B. One F mare died and her colt was weaned at 150 days of age. Another F colt died around 150 days of age from septicemia. All other foals were weaned at 180 days of age.

Bodyweight and BCS in mares. Fig 2 presents mares' bodyweights and BCS. Statistical analyses of BCS were performed from the 2nd month of pregnancy.

From gestational days 0 to 195, bodyweights were similar between both groups, but varied significantly with time (p<0.001). From gestational days 210 to 315, a significant dietary effect (p = 0.016) and time effect (p<0.001) were observed on bodyweights, with a significant diet:time interaction (p = 0.009). F mares were significantly lighter than B mares on gestational days 270 (-6.1%), 285 (-6.2%), 300 (-8.0%) and 315 (-8.5%). From suckling days 1 to 180, a significant time effect (p<0.001) and diet:time interaction (p = 0.034) were observed on bodyweights, whereas the dietary effect tended to be significant (p = 0.067). F mares tended to be lighter than B mares on suckling days 1, 15, 30 and 60.

From gestational days 45 to 195, BCS were similar between both groups, but varied significantly with time (p<0.001). From gestational days 225 to 315, no time effect was observed, but BCS were significantly affected by diet (p<0.001), with a significant diet:time interaction (p = 0.007). F mares had significantly lower BCS on gestational days 225, 255, 285 and 315. From suckling days 30 to 180, a significant dietary effect (p<0.001), time effect (p<0.001) and diet:time interaction (p<0.001) were observed. F mares had significantly lower BCS on suckling days 30, 60 and 90.

Glucose homeostasis in mares. The effect of maternal diet and meal time on daily glucose and insulin concentrations was studied. Data are shown in Fig 3. Plasma glucose concentrations varied significantly with diet (p<0.001) and time of the day (p<0.001) with a significant diet:time interaction (p<0.001). B mares had significantly higher plasma glucose concentrations at 8:30 AM, 10:30 AM, 2:30 PM, 3:30 PM, 4:30 PM, 5:30 PM and 6:30 PM than F mares. Plasma insulin concentrations varied significantly with diet (p = 0.013) and time of the day (p<0.001) with a significant diet:time interaction (p = 0.015). B mares had significantly higher plasma insulin concentrations at 10:30 AM and tended to have higher concentrations at 9:30 AM, 11:30 AM, 2:30 PM and 5:30 PM.

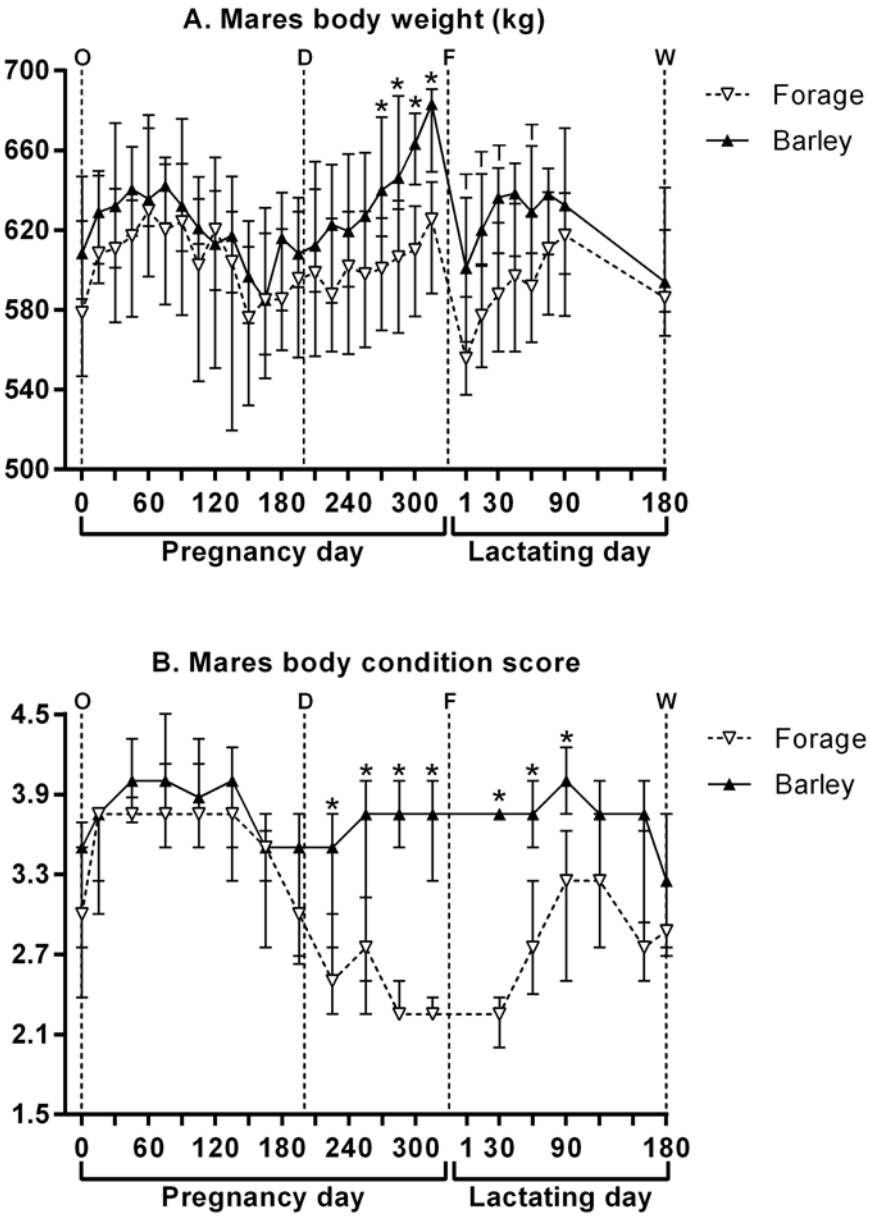


Fig 2. Mares' bodyweight (A) and body condition score (B) (median and IQR) throughout pregnancy and lactation. O: ovulation, D: start of the diet, F: foaling, W: weaning. Values under the asterisks significantly differ between groups and those under letter "T" tend to differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

doi:10.1371/journal.pone.0122596.g002

IVGTT were performed before and after the dietary treatment started. Data are shown in Fig 4. No difference between groups was observed in August. Plasma glucose increments, AUC and maximal increment during IVGTT in February were unaffected by diet. Plasma insulin increments, however, were significantly higher in B *versus* F mares at 7, 12, 15, 30, 60 and 90 min after the injection started ($p = 0.002$ for the dietary effect). Plasma insulin AUC was significantly increased in B *versus* F mares ($p = 0.009$), and the maximal plasma insulin increment tended to be significantly higher in B *versus* F mares ($p = 0.057$).

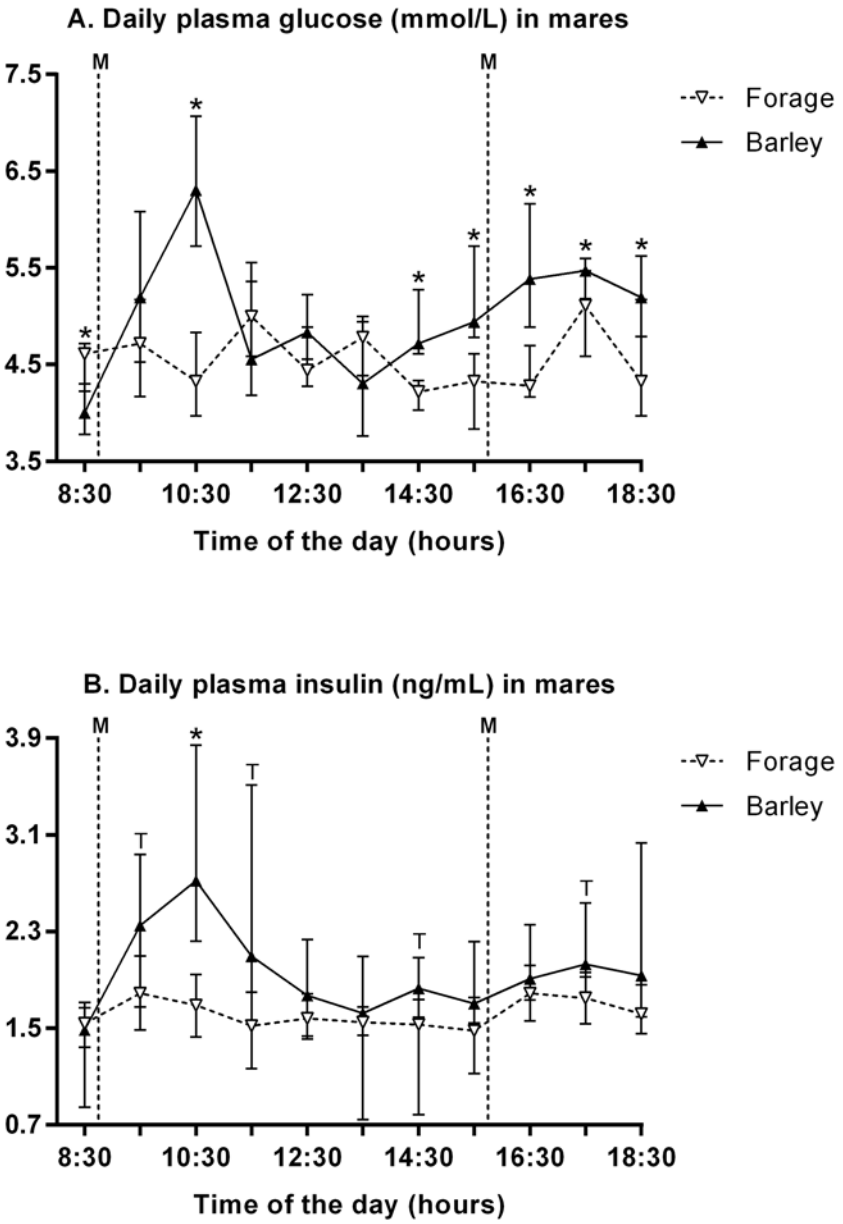


Fig 3. Mares' plasma glucose (A) and insulin (B) concentrations (median and IQR) over a 10-hour monitoring period a fortnight after start of the diet. M: meals. Values under the asterisks significantly differ and those under letter "T" tend to differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

doi:10.1371/journal.pone.0122596.g003

Plasma NEFA and leptin in mares. Fig 5 presents mares' plasma NEFA and leptin concentrations. Statistical analyses of both parameters were performed from the 2nd month of pregnancy.

From gestational days 45 to 195, plasma NEFA concentrations were similar between both groups but varied significantly with time ($p<0.001$). From gestational days 225 to 315, a significant dietary effect ($p = 0.007$) and time effect ($p<0.001$) were observed on plasma NEFA concentrations. F mares had higher plasma NEFA concentrations than B mares on gestational days 225 and 315. Throughout suckling, plasma NEFA concentrations varied significantly only with time ($p<0.001$).

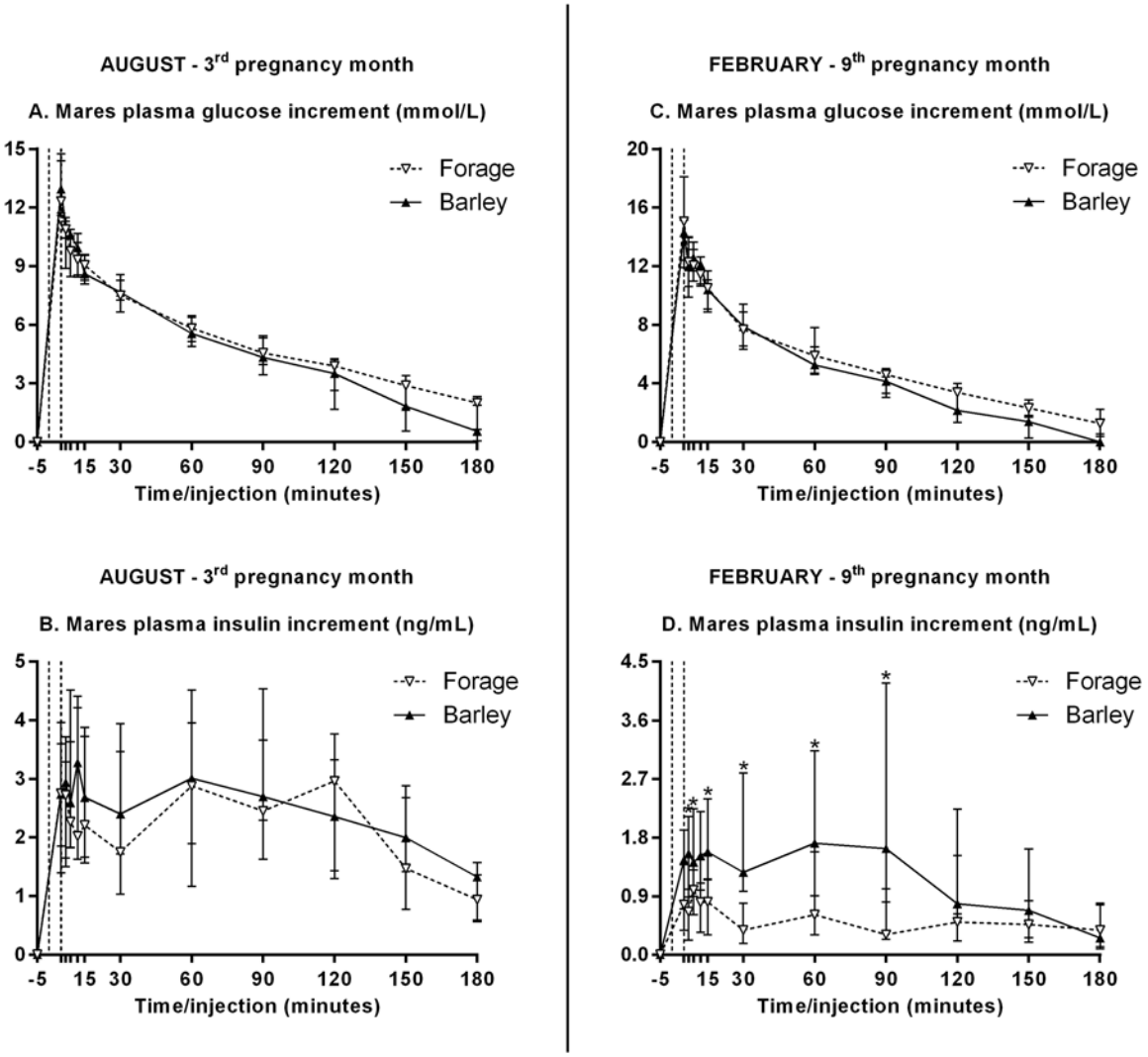


Fig 4. Mares' plasma glucose and insulin increments (median and IQR) during IVGTT before (A, B) and after (C, D) start of the diet. The 5-min period between both dotted lines stands for the glucose injection time. Values under the asterisks significantly differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

doi:10.1371/journal.pone.0122596.g004

From gestational days 45 to 195, plasma leptin concentrations were similar between both groups but varied significantly with time ($p<0.001$). From gestational days 225 to 315, no significant dietary or time effect was observed. Throughout suckling, plasma leptin concentrations varied significantly with time ($p = 0.019$) and the dietary effect and diet:time interaction tended to be significant ($p = 0.089$ and $p = 0.090$). F mares tended to have lower plasma leptin concentrations on suckling day 1.

Effects of diets in foals

Body measurements in foals. Table 5 presents foals' bodyweight, withers' height and chest circumference at 1 and 180 days of age. All body measurements increased significantly with age ($p<0.001$) without any significant dietary or sex effect. Daily weight gain remained unchanged by diet or sex.

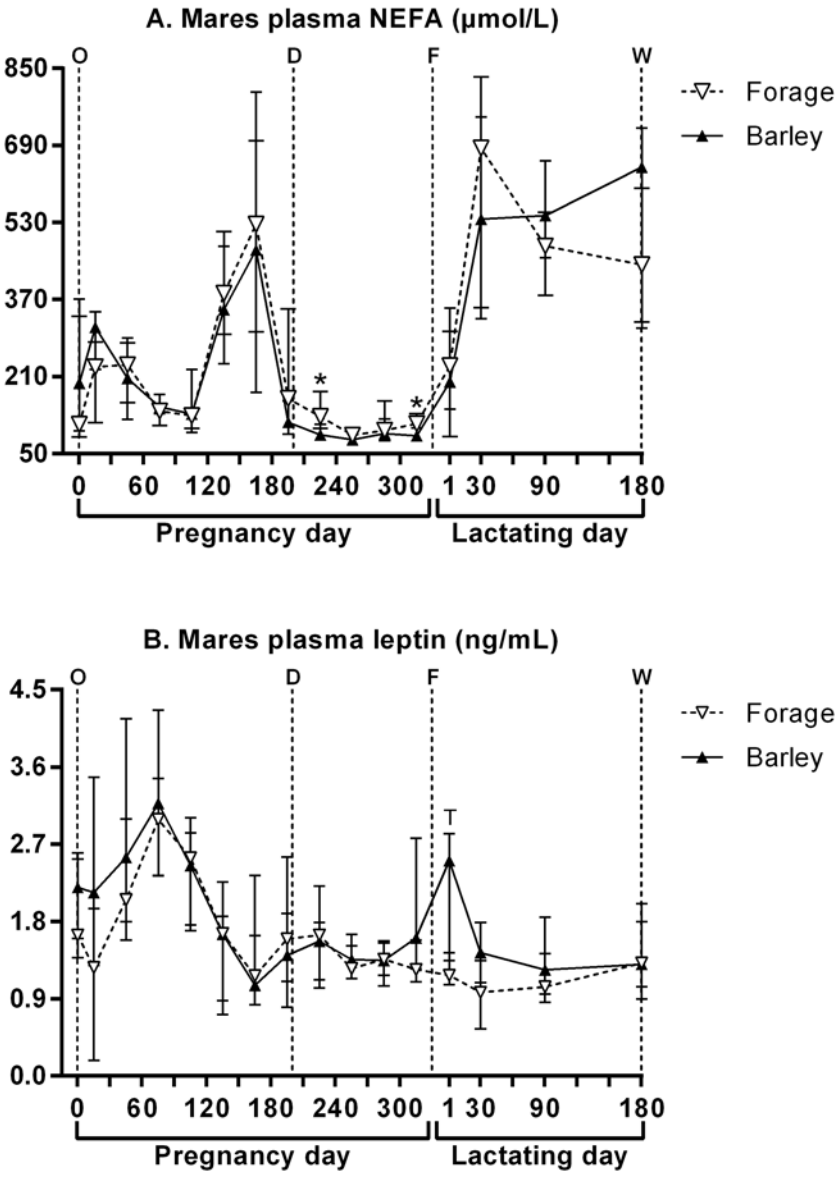


Fig 5. Mares' plasma NEFA (A) and leptin (B) concentrations (median and IQR) throughout pregnancy and lactation. O: ovulation, D: start of the diet, F: foaling, W: weaning. Values under the asterisks significantly differ and those under letter "T" tend to differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

doi:10.1371/journal.pone.0122596.g005

Glucose homeostasis in foals. Fasting glycemia decreased significantly as foals became older ($p<0.001$), reached a nadir at 90 days of age and remained stable thereafter. Fasting glycemia was unaffected by diet or sex.

Table 5 presents data from glucose metabolism testing. During IVGTT at 3 days of age, plasma glucose concentrations peaked 3 min after the start of the glucose injection. Plasma glucose increments were significantly affected by diet ($p = 0.012$), tended to be higher 3 min post-injection and were significantly higher 5 min post-injection in F *versus* B foals. Plasma glucose AUC tended to be higher in F *versus* B foals ($p = 0.087$) and maximal increments were unaffected by diet. Plasma insulin concentrations peaked 5 min after the glucose injection started. Plasma

Table 5. Foals parameters in groups "forage" and "barley" (median [quartile 1-quartile 3]).

	Age (days)	Group "forage" (n = 13 or n = 12)	Group "barley" (n = 11)	Diet effect (F2-LD-F1 model)
Bodyweight (kg)	**1**	53.7 [50.0–59.7]	54.3 [50.3–58.3]	p = 0.72
	180	241.5 [224.1–266.5]	249.6 [243.5–252.4]	
Withers' height (cm)	**1**	101.0 [100.0–102.5]	100.5 [99.3–103.0]	p = 0.35
	180	134.0 [130.5–136.0]	131.0 [130.0–133.5]	
Chest circumference (cm)	**1**	85.0 [85.0–90.0]	85.0 [82.3–86.3]	p = 0.94
	180	144.0 [139.3–146.8]	142.5 [140.0–143.5]	
IGF-1 (ng/mL)	**0**	164.6 [147.4–194.2]	189.9 [165.2–200.7]	p = 0.53
	180	272.7 [223.8–382.8]	335.6 [287.1–362.3]	
T_4 (ng/mL)	**0**	408.4 [328.6–427.1]	370.7 [352.9–423.3]	p = 0.25
	180	26.4 [21.0–29.2]	22.4 [18.3–24.6]	
T_3 (ng/mL)	**0**	5.7 [4.2–6.5]	5.4 [3.9–8.5]	p = 0.53
	180	0.36 [0.31–0.53]	0.36 [0.31–0.44]	
NEFA (µmol/L)	**3**	787.0 [612.0–889.0]	679.0 [452.5–822.5]	p = 0.77
	180	647.5 [417.5–924.5]	660.0 [426.0–912.5]	
Osteocalcin (ng/mL)	**3**	68.9 [40.8–92.0]^T	107.6 [56.2–165.2]	**p = 0.054**
	130	16.2 [13.3–21.6]	15.0 [9.9–22.5]	
Hydroxyproline (mg/L)	**3**	18.5 [14.5–21.3]	16.8 [15.6–18.2]	p = 0.96
	130	8.3 [7.9–8.8]	8.8 [8.6–8.8]	
CTX-II (ng/mL)	**3**	2.5 [1.9–2.6]	2.7 [2.4–3.8]	p = 0.11
	130	1.1 [1.0–1.1]	1.1 [1.1–1.2]	
	Age (days)	**Group "forage" (n = 13 or n = 12)**	**Group "barley" (n = 11)**	**Diet effect (Mann-Whitney test)**
Leptin (ng/mL)	**180**	1.3 [1.2–1.4]	1.3 [1.3–1.4]	p = 0.70
Glucose AUC (mmol.min/L)	**3**	114.8 [106.6–133.7]	99.5 [77.1–120.4]	**p = 0.087**
	130	411.0 [338.9–498.1]	409.6 [382.5–448.4]	p = 0.75
Insulin AUC (ng.min/L)	**3**	28.6 [20.0–37.4]	23.8 [17.8–29.9]	p = 0.27
	130	30.2 [17.1–46.9]	33.7 [22.0–42.3]	p = 0.79
Glucose metabolism rate (mmol/kg/min)	**200**	0.016 [0.014–0.022]	0.017 [0.016–0.021]	p = 0.54

P-values are given for the diet effect on each parameter. For repeated measures, p-values are those obtained using the F2-LD-F1 model. For non-repeated measures, p-values are those obtained using the Mann-Whitney test.

doi:10.1371/journal.pone.0122596.t005

insulin increments, AUC and maximal increments were unaffected by diet. During IVGTT at 130 days of age, plasma glucose and insulin increments were not affected by diet anymore. No sex effect was observed at both ages.

No dietary effect was observed on glucose metabolism rates during hyperinsulinemic euglycemic clamps at 210 days of age. Fillies, however, had a significantly higher glucose metabolism rate than colts (p = 0.042).

Plasma NEFA and leptin in foals. Table 5 presents foals' plasma NEFA concentrations at 3 and 180 days and plasma leptin concentrations at 180 days. No effect of age, diet or sex was observed on both parameters.

Plasma IGF-1, T_4 and T_3 in foals. Table 5 presents plasma IGF-1, T_4 and T_3 concentrations at 0 and 180 days of age. Plasma IGF-1 significantly increased whereas T_4 and T_3 concentrations significantly decreased as foals became older ($p<0.001$ for the three parameters), without any significant dietary effect. Plasma IGF-1 concentrations were subject to a significant

Table 6. Foals' relative risk and odds ratio of osteochondrosis in groups "forage" and "barley" at 218 days of age.

	Group "forage" (n = 12)	Group "barley" (n = 11)	Z statistic	Significancelevel
Number of unaffected foals	10	6		
Number of osteochondrosis positive foals	2	5		
Relative risk	0.3667	2.7273	1.384	p = 0.1665
95% confidence interval	0.08852–1.5187	0.6584–11.2964		
Odds ratio	0.2400	4.1667	1.452	p = 0.1466
95% confidence interval	0.0394–1.6486	0.6066–28.6219		

doi:10.1371/journal.pone.0122596.t006

sex effect (p = 0.008), with fillies having significantly lower plasma concentrations than colts at birth, 130 and 180 days of age. Plasma T_4 and T_3 concentrations were unaffected by sex.

Serum osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II. Table 5 presents serum osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II concentrations at 3 and 130 days. All three parameters decreased significantly as foals became older ($p<0.001$ for all three parameters). Only serum osteocalcin concentrations tended to be affected by diet (p = 0.054) with a diet:time interaction (p = 0.055). F foals tended to have lower serum osteocalcin concentrations than B foals at 3 days of age. No sex effect was found on any of the three parameters.

Osteochondrosis lesions. Seven foals were osteochondrosis-positive at 218 days of age: 2 fillies in group F (16.7%) *versus* 5 foals (4 fillies and 1 colt) in group B (45.5%). Neither relative risks nor odds ratios differed between both groups (Table 6). Both affected foals of group F presented 2 osteochondrosis lesions, localized in the right hock and left stifle for one foal and in both hocks for the other foal. The five affected foals of group B presented only one osteochondrosis lesion, localized in one or the other of the hocks for 2 of them, localized in one or the other of the stifles for 2 other foals and in the left front fetlock for the last one.

Discussion

Cracked barley provided additional net energy and digestible proteins to mares from the 7th month of pregnancy. Barley containing meals induced a sharp peak of both glycemia and insulinemia in the morning, followed by a second rise of glycemia in the afternoon associated with a slight increase of insulinemia. Barley enabled mares to maintain optimal body condition throughout pregnancy and lactation and to gain bodyweight until parturition. On the opposite, mares fed forage dramatically lost body condition until return to pasture and gained less bodyweight throughout pregnancy. They demonstrated energy deficit as shown by transient higher plasma NEFA concentrations during dietary treatment. In the 9th month of pregnancy, insulin secretion in response to glucose injection was markedly lowered in mares fed forage, with unaffected glucose clearance.

No difference was found in pregnancy length, foals' measurements or endocrine factors of growth from birth until weaning. F foals, however, tended to be more tolerant to glucose at 3 days of age, as demonstrated by amplified glucose response and slowed-down glucose clearance after injection, without any variation in insulin response. F foals also had lower osteocalcin concentrations at the same age. Those alterations were corrected at the time of weaning. Preliminary data on osteoarticular status shortly after weaning showed increased incidence of osteochondrosis lesions in foals born to dams fed barley but this was not significant.

Nutritional offer to mares

B mares received more net energy (up to 59.9% more) and digestible proteins (up to 89.2% more) than F mares between the 7th and 10th month of pregnancy. Energy supply was similar

between both groups thereafter, whereas F mares received more proteins than B mares. Hay batches given from the 10th month of pregnancy differed from that used from the 7th to 10th month of pregnancy by their nutritional properties, with higher energy, nitrogen, phosphorus and calcium contents. Energy provided by each diet differed by their amounts, but also by their nature: forage provides mainly energy derived from volatile fatty acids, whereas barley provides energy derived from simple carbohydrates. Nitrogen concentrations in both diets did not exceed 100% of current INRA recommendations for broodmares [14]. Besides, the calcium to phosphorus ratio remained in a range from 1 to 3, as recommended to avoid calcium absorption defects and bone demineralization due to phosphorus excess, as well as magnesium and trace elements (manganese, zinc, iron, copper and iodine) absorption defects due to calcium excess [14]. On the opposite, B mares received lower amounts of fiber (up to 39.8% less) *i.e.*, less than 30% fiber whereas F mares received between 28% and 35% fiber. Fiber excess (>30%), however, is susceptible to limit digestibility of other compounds of the diet, as well as the feed intake necessary to cover nutritional requirements [14].

Effects of diets in mares

B mares maintained BCS higher than 3.5 until parturition which is considered optimal for future lactation. On the opposite, F mares' BCS fell below 2.5 until parturition which is considered insufficient [15]. F mares' BCS did not start to increase before the 2nd suckling month. This could have altered milk composition since reforming body stores prevails over lactation in mares. Indeed, in thin mares, close to 30% of the energy intake enables stores deposit, whereas in fat mares, most energy is used for milk lipids synthesis [22]. Such a loss of body condition and such lower bodyweights were previously reported in Quarter Horse mares conducted in pasture (estimated to receive 100% of NRC digestible energy recommendations) *versus* mares conducted in pasture and supplemented with grain mix (120% of NRC digestible energy recommendations) in the last third of pregnancy. Light breed mares receiving low *versus* high starch isocaloric and isonitrogenous diets from the 7th month of pregnancy also lost body condition and presented lower bodyweights, even if to a lesser extent [12].

F mares presented a transient increase in plasma NEFA concentrations at the start and at the end of the dietary treatment compared to B mares. This suggests increased lipids mobilization in lean mares, as previously described in non-pregnant light breed mares in which digestible energy restriction increased by 2.5 plasma NEFA concentrations [23]. Plasma leptin concentrations, which are related to fat deposit and BCS in mares [24], were mainly unchanged between both diets. Only a tendency for lower plasma leptin concentrations was found in F mares on the 1st suckling day, although a decrease could also be expected before parturition as shown in mares conducted in pasture only [25] or fed a moderate energy diet [26]. Decreased plasma leptin concentrations are consistent with the lower BCS observed in our mares, but variations are so weak that they moderate potential increased lipids mobilization suggested above.

Plasma glucose and insulin concentrations in B mares peaked within 2 h after the 1st meal and only slightly increased after the 2nd meal, as was found in non-pregnant mares receiving various amounts of supplements of varying composition (mainly cracked corn, cottonseed hulls, corn gluten meal and molasses) [23]. Daily plasma glucose and insulin concentrations in response to feeding or fasting were in the same range as reported in non-pregnant mares [23], young geldings [27] and adult mares and stallions [28]. On the other side, energy and nitrogen restriction did not affect glucose clearance rate, but decreased insulin secretion during IVGTT in F mares in the 9th month of pregnancy. This is consistent with reports of unaffected glucose clearance rate but reduced insulin secretion during IVGTT in non-pregnant mares fed half energy and half protein requirements (both groups receiving concentrates). Frequently-sampled

intravenous glucose tolerance test (FSIGT) in pregnant mares fed high *versus* low energy diets in the last trimester, however, did not evidence any alteration in insulin sensitivity, glucose effectiveness or beta-cell responsiveness, nor in late pregnancy neither later in lactation [29]. But the authors repeated the experiment in order to increase variations in body condition between both groups (high BCS in the high energy fed group *versus* low BCS in the low energy fed group), so that they induced lower insulin sensitivity and lower acute insulin response to glucose in mares fed the low energy diet [30]. This diminished responsiveness of beta-cells is consistent with our results. This is surprising since insulin sensitivity is known to decline throughout pregnancy [31]. We could have expected amplified beta-cell secretion to compensate for the lower insulin-mediated glucose uptake. Such an inadequate beta-pancreatic function, together with severe insulin resistance reflects gestational diabetes mellitus in thin women [32], quite similarly to our low-BCS mares fed forage only.

Effects of diets in foals

The diets that we used elicited different glucose and insulin responses in mares. Thus, fetal development could have been affected by barley supplementation. Pregnancy length and foals' body measurements at birth were similar between both groups. This is consistent with previous work inducing dietary metabolic variations in pregnant mares [11, 12, 25, 33]. As discussed above, body condition of mares could have affected immunoglobulins concentrations in colostrum [33] or milk composition [22]. Milk data are not available at this time. Foals' growth, however, is used as an indirect marker of milk yield. Here, none of the foals' body measurements was affected by the dams' diet until weaning. These data are consistent with similar leptin concentrations at weaning, indicating similar fat deposit in both groups at this age. We were not able to measure foals' plasma leptin concentrations earlier in the suckling period but foals born to dams fed either a high or low energy diet were shown to have similar plasma leptin concentrations in the first two weeks [26]. In the same way, all foals had similar lipid mobilization as shown by similar plasma NEFA concentrations until weaning.

Here, fasting glucose concentrations from birth to weaning were independent from the mares' diet. Energy and nitrogen restriction in late pregnancy, however, slightly affected glucose tolerance of F foals in the immediate post-natal period. F foals had similar insulin secretion to B foals but slowed-down glucose clearance rate. This coincides with lower insulin sensitivity and glucose effectiveness observed during FSIGT in 2-week old foals born to dams fed a low energy diet [29]. We found that all effects on glucose and insulin homeostasis had vanished in F foals at weaning and again, this is consistent with data from 4-month old foals born to dams fed a low energy diet [29]. Concomitantly, F foals tended to have lower serum osteocalcin concentrations. Osteocalcin is a hormone released by osteoblasts which stimulates beta-cell proliferation and expression of insulin-encoding genes in beta-cells [34]. Its action on adipocytes also increases adiponectine release, which improves tissues sensitivity to insulin by enhancing glucose uptake by cells [35]. This could be an explanation for a tendency for higher glucose tolerance in F foals.

It is established that cereals-rich rations of foals increase their predisposition to osteochondrosis [36–40], because they enhance postprandial glycemia and evoke a peak of insulinemia [41]. Insulin is involved in cartilage metabolism through the Growth Hormone, IGF-I [42] and thyroid hormones [43], reducing chondrocytes maturation and bone formation. To date, only one epidemiological study demonstrated an adverse effect of concentrates in the ration of the pregnant mare on the development of osteochondrosis in foals [13]. Here, radiographic examination showed that F foals were less affected by osteochondrosis than B foals in the immediate post-weaning period, even if not significant. These could be related to the lower serum

osteocalcin concentrations observed in B foals earlier and would be consistent with previous report in foals with severe radiographic findings [18]. This is in favor of a deleterious impact of feeding pregnant mares with concentrates in late pregnancy on osteoarticular status in foals. But osteochondrosis is a dynamic pathology and most lesions are susceptible to have evolved at one year of age. Further examination is needed to confirm this observation.

Conclusion

In conclusion, our management of broodmares feeding elicits two different metabolic responses as regards energy balance and glucose homeostasis. Mares fed forage seem to develop a syndrome closed to gestational diabetes mellitus in women. This is worrying since it has been demonstrated to persist in the following pregnancy [44]. Few effects observed on foals' metabolism had disappeared at weaning, but other factors could have been affected and any events in later life could reveal new programming aspects by the plane of nutrition of pregnant mares.

Supporting Information

S1 Dataset. Mares' features and body measurements.
(XLS)

S2 Dataset. Mares' daily plasma glucose and insulin concentrations.
(XLS)

S3 Dataset. Mares' plasma glucose and insulin concentrations during IVGTT in August and February.
(XLS)

S4 Dataset. Mares' blood parameters.
(XLS)

S5 Dataset. Foals' body measurements.
(XLS)

S6 Dataset. Foals' plasma glucose and insulin concentrations during metabolic tests at 3, 130 and 210 days of age.
(XLS)

S7 Dataset. Foals' blood parameters.
(XLS)

S8 Dataset. Foals' osteochondritic status.
(XLS)

S1 Text. R input code for F1-LD-F1 and F2-LD-F1 tests.
(PDF)

Acknowledgments

The authors are grateful to William Martin-Rosset for design of the nutritional plane of broodmares, Joseph Bellonie and Patrice Dupuis for care and management of animals and assistance during metabolic tests, Françoise Ternois for management of NEFA assays, Sarah Valentino for assistance during IVGTT, Céline Houdard for management of clamps and Isabelle Caudron and Brigitte Deliège for management of X-rays.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PCP LW CS DS. Performed the experiments: PP LW CD MD DG SC VB ER MPT LM. Analyzed the data: PP MR AT LM JPL. Wrote the paper: PP AT PCP SC.

References

1. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. Bmj. 1990; 301(6761):1111. PMID: 2252919; PubMed Central PMCID: PMC1664286.
2. Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. Reproductive toxicology. 2005; 20(3):345–52. doi: 10.1016/j.reprotox.2005.04.005 PMID: 15893910.
3. Gluckman PD, Hanson MA. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. Seminars in fetal & neonatal medicine. 2004; 9(5):419–25. doi: 10.1016/j.siny.2004.03.001 PMID: 15691778.
4. Stettler N, Zemel BS, Kumanyika S, Stallings VA. Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. Pediatrics. 2002; 109(2):194–9. PMID: 11826195.
5. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? The Journal of physiology. 2004; 561(Pt 2):355–77. doi: 10.1113/jphysiol.2004.072009 PMID: 15459241; PubMed Central PMCID: PMC1665360.
6. Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Stewart F, Ousey J, Ousey J, et al. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. The Journal of endocrinology. 2002; 172(2):237–46. PMID: 11834441.
7. Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. Reproduction. 2004; 127(1):67–77. doi: 10.1530/rep.1.00024 PMID: 15056771.
8. Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. PloS one. 2014; 9(7):e102044. doi: 10.1371/journal.pone.0102044 PMID: 25006665; PubMed Central PMCID: PMC4090198.
9. Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. The Journal of endocrinology. 2004; 181(3):459–67. PMID: 15171694.
10. Giussani DA, Forhead AJ, Gardner DS, Fletcher AJ, Allen WR, Fowden AL. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. The Journal of physiology. 2003; 547(Pt 1):67–76. doi: 10.1113/jphysiol.2002.027409 PMID: 12562940; PubMed Central PMCID: PMC2342620.
11. Ousey JC, Fowden AL, Wilsher S, Allen WR. The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. Equine veterinary journal. 2008; 40(7):673–9. PMID: 19165937.
12. George LA, Staniar WB, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. Domestic animal endocrinology. 2009; 37(1):23–9. doi: 10.1016/j.domaniend.2009.01.003 PMID: 19359126.
13. van der Heyden L, Lejeune JP, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, et al. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. The Veterinary record. 2013; 172-(3):68. doi: 10.1136/vr.101034 PMID: 23118049.
14. Martin-Rosset W. Nutrition et alimentation des chevaux. France: Quae; 2012. 624 p.
15. Arnaud G. Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport. Paris, France: Institut de l'Elevage, INRA, Institut Français du Cheval et de l'Equitation; 2000.
16. Salazar-Ortiz J, Camous S, Briant C, Lardic L, Chesneau D, Guillaume D. Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (Equus caballus). Reproductive biology and endocrinology: RB&E. 2011; 9:130. doi: 10.1186/1477-7827-9-130 PMID: 21958120; PubMed Central PMCID: PMC3195710.
17. Jaeschke G. Routine determination of free hydroxyproline in horse serum methods and normal values. Zentralblatt für Veterinarmedecin A. 1975; 22:89–101.
18. Valette JP, Robert C, Toquet MP, Denoix JM, Fortier G. Evolution of some biochemical markers of growth in relation to osteoarticular status in young horses: results of a longitudinal study in three breeds. Equine and Comparative Exercise Physiology. 2007; 4(1):23–9.

19. Denoix JM. Sémiologie radiographique générale des articulations. Pratique Vétérinaire Equine. 1990; 22:14–27. doi: 10.1016/j.cognition.2014.11.038 PMID: 25506774
20. van Weeren PR. Aetiology, diagnosis and treatment of OC(D). Clinical Techniques in Equine Practice. 2006; 5:248–58.
21. Noguchi K, Gel Y, Brunner R, Konietschke F. nparLD: an R software package for non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. Journal of Statistical Software. 2012; 50:1–23. PMID: 25317082
22. Doreau M. Le lait de jument et sa production: particularités et facteurs de variation. Lait. 1994; 74:401–18.
23. Sticker LS, Thompson DL Jr, Bunting LD, Fernandez JM, DePew CL. Dietary protein and(or) energy restriction in mares: plasma glucose, insulin, non-esterified fatty acid, and urea nitrogen responses to feeding, glucose, and epinephrine. Journal of animal science. 1995; 73(1):136–44. PMID: 7601726.
24. Gentry LR, Thompson DL Jr, Gentry GT Jr, Davis KA, Godke RA, Cartmill JA. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. Journal of animal science. 2002; 80(10):2695–703. PMID: 12413093.
25. Cavinder CA, Burns SA, Coverdale JA, Hammer CJ, G H, Hinrichs K. Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. The professional animal scientist. 2012; 28:344–50.
26. Song X, Anderson ST, Cawdell-Smith AJ, Foote CE, Bryden WL, editors. Response of plasma leptin concentrations in mares and foals to maternal body condition. Australasian Equine Science Symposium; 2014; Gold Coast, QLD.
27. Stull CL, Rodiek AV. Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. The Journal of nutrition. 1988; 118(2):206–13. PMID: 3276847.
28. DePew CL, Thompson DL Jr, Fernandez JM, Sticker LS, Burleigh DW. Changes in concentrations of hormones, metabolites, and amino acids in plasma of adult horses relative to overnight feed deprivation followed by a pellet-hay meal fed at noon. Journal of animal science. 1994; 72(6):1530–9. PMID: 8071178.
29. Dobbs TN, Foote CE, Cawdell-Smith AJ, Anderson DL, Boston RC, Bryden WL, editors. Glucose and insulin dynamics in mares and their foals. Australasian Equine Science Symposium; 2012; Gold Coast, QLD.
30. Anderson ST, Song X, Velez Aramburo ME, Bartels RA, Cawdell-Smith AJ, Foote CE, et al., editors. Mares of lower body condition score exhibit marked insulin resistance and reduced insulin secretion in late gestation. Australasian Equine Science Symposium; 2012; Gold Coast, QLD.
31. Fowden AL, Comline RS, Silver M. Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. Equine veterinary journal. 1984; 16(4):239–46. Epub 1984/07/01. PMID: 6383807.
32. Kautzky-Willer A, Prager R, Waldhausl W, Pacini G, Thomaseth K, Wagner OF, et al. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. Diabetes care. 1997; 20(11):1717–23. PMID: 9353615.
33. Thorson JF, Karren BJ, Bauer ML, Cavinder CA, Coverdale JA, Hammer CJ. Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: foaling data. Journal of animal science. 2010; 88(3):982–90. doi: 10.2527/jas.2008-1646 PMID: 19897623.
34. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin promotes beta-cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. Diabetes. 2014; 63(3):1021–31. doi: 10.2337/db13-0887 PMID: 24009262; PubMed Central PMCID: PMC3931403.
35. Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2008; 19(5):161–6. doi: 10.1016/j.tem.2008.02.006 PMID: 18407515.
36. Glade MJ, Belling TH. A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. Journal of equine veterinary science. 1986; 6:151–5.
37. Savage CJ, McCarthy RN, Jeffcott LB. Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals. Equine veterinary journal supplement. 1993; 16:74–9.
38. Glade MJ, Belling TH Jr. Growth plate cartilage metabolism, morphology and biochemical composition in over- and underfed horses. Growth. 1984; 48(4):473–82. PMID: 6532905.
39. Ralston SL. Hyperglycemia/hyperinsulinemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondritis dissecans (OCD) lesions. Pferdeheilkunde. 1996; 12:320–2.
40. Pagan JD, Geor RJ, Caddel SE, Pryor PB, Hoekstra KE, editors. The relationship between glycemic response and the incidence of OCD in thoroughbred weanlings:a field study. AAEP; 2001.
41. Glade MJ, Gupta S, Reimers TJ. Hormonal responses to high and low planes of nutrition in weanling thoroughbreds. Journal of animal science. 1984; 59(3):658–65. PMID: 6386779.

42. Henson FM, Davenport C, Butler L, Moran I, Shingleton WD, Jeffcott LB, et al. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. Equine veterinary journal. 1997; 29(6):441–7. PMID: 9413716.

43. Glade MJ, Reimers TJ. Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, tri-iodothyronine and insulin concentrations in young horses. The Journal of endocrinology. 1985; 104(1):93–8. PMID: 3881553.

44. Anderson ST, Song X, Cawdell-Smith AJ, Foote CE, Boston RC, Bryden WL, editors. Pregnant mares with insulin resistance and beta cell failure continue to exhibit glucose intolerance and diminished insulin responses in a subsequent pregnancy. Australasian Equine Science Symposium; 2014; Gold Coast, QLD.

Revues

Revue 1 : Does maternal size, nutrition and metabolic status affect offspring production traits in domestic species?

Morgane Robles, Pascale Chavatte-Palmer

Animal Reproduction, 2017, 14;3:528-537
DOI: 10.21451/1984-3143-AR996

DOI: 10.21451/1984-3143-AR996

Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017.

Does maternal size, nutrition and metabolic status affect offspring production traits in domestic species?

Morgane Robles, Pascale Chavatte-Palmer[1]

UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France.

Abstract

The Developmental Origins of health and Disease state that environmental conditions during pregnancy affect long term outcomes in offspring. In the present paper, effects of maternal size and breed as well as maternal nutrition on offspring size, growth and production traits are described. Although birthweight is mostly not affected, metabolic perturbations are often observed in adult offspring. In animal production, however, the relation between developmental conditions and long-term offspring outcome may remain unnoticed. Nevertheless, improving dams' health and nutrition before and during pregnancy may help improving production traits in domestic animals.

Keywords: DOHaD, embryo transfer, fetal programming, nutrition, pregnancy.

Introduction

In mammals, developmental conditions at the time of conception, during pregnancy and the neonatal period are known to affect long-term post-natal health, as known under the term "Developmental Origins of Health and Disease" (DOHaD). This phenomenon, is associated with modifications in gene expression due to environmentally induced epigenetic mechanisms. Maternal environment, such as maternal metabolism and nutrition, or the use of reproductive biotechnologies, may have an effect on feto-placental development, growth and subsequent adult health, thus affecting offspring performance and longevity.

This article aims to summarize existing knowledge on long term effects of maternal phenotype in domestic species and their potential impact on animal health, fertility and welfare. Future directions both in research and for improvement of field management are discussed.

The other side of genetics: effect of maternal phenotype/genotype

Genetic selection for production traits is the basis of animal breeding. Taking into consideration maternal genetic value and production, the sire is selected based on his genetic indices and heritability, in order to improve desired production traits. Maternal genotype and phenotype are also seminal in determining the environment in which the embryo and fetus will develop, regardless of production traits. This can be studied by comparing cross-bred offspring born to dams of different genotypes, or by studying phenotypic variation in genetically identical animals (Fig. 1).

In pigs, the cross-breeding between Meishan sows (200 kg adult weight) and Yorkshire males (300 kg adult weight) yields lighter piglets than the opposite crossing (Meishan males and Yorkshire sows; Biensen *et al.*, 1999). Similarly, in cattle, calves born to South Devon cows (790 kg adult weight) and Dexter bulls (340 kg adult weight) were approximately 6 kg heavier than crossbred calves born to a Dexter cow (Joubert and Hamond, 1958). Moreover, Charolais breed embryos transferred into Brahman cows are lighter at birth (mean 29 kg) compared to Charolais embryos transferred into Charolais recipients (mean 63 kg). Inversely, Brahman embryos transferred into Charolais recipients result in calves with heavier birthweight (mean 41 kg) than those produced by the transfer of Brahman embryos into Brahman cows (mean 19 kg; Ferrell, 1991). These results indicate that maternal breed and consequently maternal size and environment will affect offspring weight and size at birth, regardless of genetic potential.

Further consequences on postnatal development have been explored in horses. In the first half of the 20th century, Walton and Hammond elegantly demonstrated, using cross-breeding between large Shire horses and small Shetland ponies, that crossbred offspring whose dam was a Shetland pony were smaller at birth and remained smaller as adults than those whose dam was a Shire mare (Walton and Hammond, 1938). Almost 50 years later, Tischner *et al.* showed that Polish pony embryos transferred into draft mares produced foals that were larger at birth and remained larger as adults, compared to those that had been transferred into mares of their own breed (Tischner *et al.*, 2000). More recently, the transfer of pony embryos into mares of larger breeds was shown to consistently increase fetal and postnatal growth until adulthood. Conversely, foals from a larger breed born to pony mares were small at birth and only partially caught-up to controls of the same breed (Allen *et al.*, 2004; Peugnet *et al.*, 2014). Moreover, both excess and reduced fetal growth were associated with osteoarticular lesions and metabolic perturbations, some of which still present at 2 years of age (Peugnet *et al.*, 2014, 2016).

Effect of maternal nutrition

Procedures in terms of maternal nutrition in domestic animals vary greatly depending on breed, location, availability of feedstuff and season, amongst other factors. The choice of dietary treatments in

[1]Corresponding author: pascale.chavatte-palmer@inra.fr
Phone: +33(1)3465-2558
Received: June 20, 2017
Accepted: July 12, 2017

experimental protocols is also very diverse, rendering it difficult to draw clear conclusions. In general, the effects of maternal nutrition on offspring phenotype are marginal, except when dietary treatments are severe and prolonged as reviewed recently (Funston *et al.*, 2012; Chavatte-Palmer *et al.*, 2015, 2016; Sinclair *et al.*, 2016; Opsomer *et al.*, 2017). The list of studies presented here does not claim to be exhaustive as the authors have selected key examples to illustrate each nutritional condition.

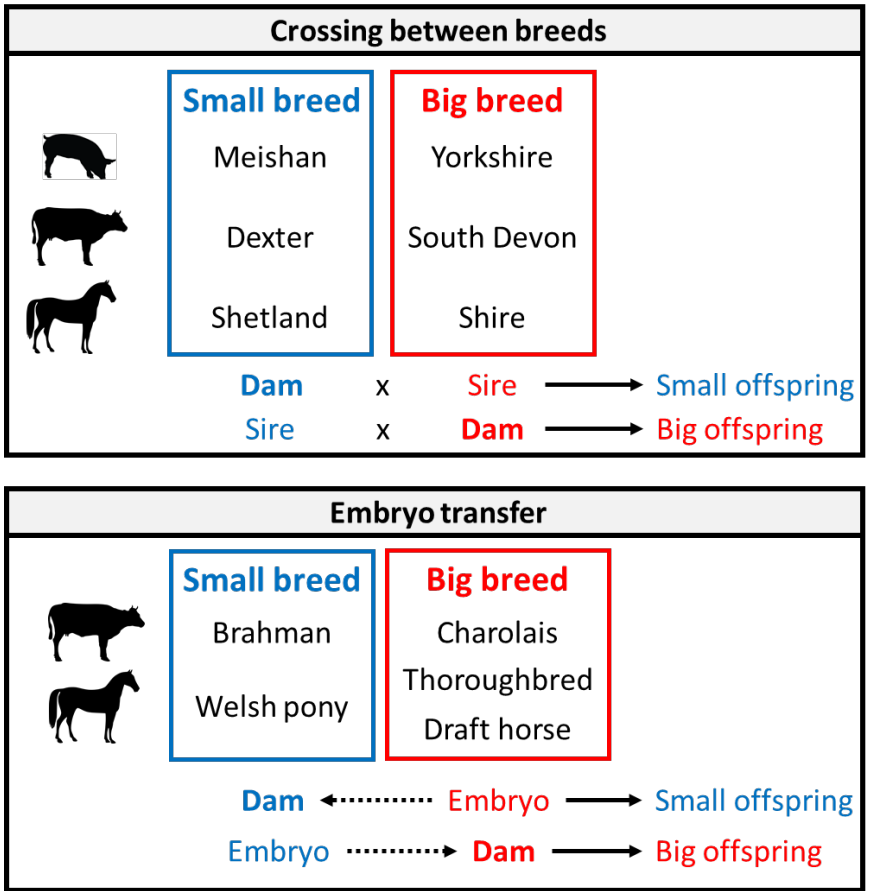


Figure 1. Effect of maternal and partenal size on offspring size after artificial insemination or embryo transfer. After Walton and Hamon (1938); Joubert and Hamon (1958); Ferrel. (1991); Biensen *et al.* (1999); Tischner *et al.* (2000); Allen *et al.* (2004); Peugnet *et al.* (2014).

Excess nutrition and obesity

In many studies, excess nutritional intake during pregnancy is confounded with maternal obesity. Obesity can be defined as excess adiposity above a certain level as defined by the authors depending on studies, before breeding and during pregnancy. Here we tried to discriminate studies with maternal gestational overfeeding from studies with maternal obesity prior to breeding.

Effects of excess maternal nutrition have been mainly studied in sheep (Table 1) with little observed effects on lamb birthweight and postnatal growth (Hoffman *et al.*, 2014; Khanal *et al.*, 2014; Kleemann *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2016). Nevertheless, expression of Insulin Growth Factor 1 (IGF1) is increased in the lamb liver (Hoffman *et al.*, 2014) resulting in increased plasma IGF1 concentrations (Hoffman *et al.*, 2016) and lipid accumulation is also observed in the lambs' muscle (Hoffman *et al.*, 2014; Reed *et al.*, 2014), together with increased insulin resistance (Hoffman *et al.*, 2016), increased adiposity (Khanal *et al.*, 2014), hyperglycemia and alteration of hepatic signaling pathways (Philp *et al.*, 2008). Finally, increased ovarian size and reduced ovarian follicular numbers have also been observed (Da Silva *et al.*, 2003; Kleemann *et al.*, 2015). *Ad libitum* access to feedstuff at adulthood (19-22 months) increased food intake, weight gain, visceral and subcutaneous fat, basal glycemia and insulinemia in all animals but offspring born to obese dams were less affected than offspring born to control dams (Long *et al.*, 2010, 2015).

When maternal obesity was induced by overfeeding dams starting 2 months before breeding and until lambing, offspring birthweight was not affected but glucose metabolism was consistently and durably altered. The number of pancreatic β-cells was reduced in fetal life, resulting in hyperglycemia, un hypoinsulinemia and reduced pancreatic weight at birth and increased insulin resistance and altered glycemic regulation in adults. Moreover, muscular fibrosis and hyperleptinemia were observed (Long *et al.*, 2010, 2015; Huang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Table 1. Summary of studies performed on the effects of overnutrition in pregnant ewes on the post-natal development of the offspring. The level of excess nutrition is expressed as a percentage of the energy content ingested by the control group.

Level of overnutrition	Period of overnutrition	Function	Age	Phenotype	Source
Periconceptioal overnutrition					
150%	From 17 days before insemination to 6 days after	Growth	Birth 5 days	= Live weight ↗ Ovary weight	Kleeman *et al*., 2015
Overnutrition in the begining of gestation					
Ad libitum	The 100 first days of gestation (2 first third)	Endocrinology Ovary function	103 days of gestation	↘ Progesterone concentration ↘ Number of primordial follicles ↘ Number of total follicles	Da Silva *et al*., 2003
175%	From 30 to 80 days of gestation	Growth Muscle function	From birth to 5 months 5 months	= Live weight ↗ Fibres density	Sen *et al*., 2016
Overnutrition in the end of gestation					
126%	From 116 days of gestation	Growth	1 day	= Live weight ↗ Heart weight	Hoffman *et al*., 2014
			3 months	↘ Live weight	
		Endocrinology	From 1 day to 3 months	↘ IGFBP3 Concentration ↗ Leptin Concentration	
		Gene expression	1 day	↗ Liver *IGF1* expression ↗ Muscle *β-catenin* expression (stimulate the differentiation of stem cells into muscle cells)	
155%	From 115 days of gestation	Carbohydrate metabolism	From 1 to 30 days	↗ Fasting glycaemia ↘ % of phosphorylated AMPK in the liver (can contribute to ↗ the production of glucose by the liver)	Philp *et al*., 2008
150%	From 105 days of gestation	Growth	From birth to 2 months	= Live weight	Khanal *et al*., 2014
			From 2 to 6 months	↘ Live weight	
		Body condition	6 months	↘ % subcutaneous adipose tissue ↘ Subcutaneous adipose tissue / Visceral adipose tissue	

Level of overnutrition	Period of overnutrition	Function	Age	Phenotype	Source
Overnutrition during the most of gestation					
140%	From 31 days of gestation	Growth	From 1 day to 3 months	↗ Live weight, thoracic perimeter	Reed *et al.*, 2014 Hoffman *et al.*, 2016 Pillai *et al.*, 2017
			1 day	↗ Length	
		Endocrinology	3 months	↗ IGF1 Concentration ↗ IGFBP2 Concentration	
		Carbohydrate metabolism	3 months	↗ Leptin concentration ↗ Insulin/basal glucose ratio ↗ Insulin resistance	
		Muscle function	1 day	↗ Fibres area (cross section) ↗ *Myostatin* expression	
			3 months	↘ Fibres area (cross section)	
			From 1 day to 3 months	↗ Lipid accumulation in muscle	
Modelling of obesity – Overnutrition throughout gestation					
150%	From 60 days before insemination	Gestation	Gestation length	↘ Gestation length	Long *et al.*, 2010 Huang *et al.*, 2012 Zhang et al., 2012 Long et al., 2015
		Growth	From birth to 19 months	= Live weight	
		Carbohydrate metabolism	135 days of gestation	↘ β pancreatic cells ↗ Production of insulin by remaining β cells	
			Birth	↗ Basale glycaemia ↘ Basale insulinemia ↘Pancreas weight	
			19 months	↗ Insulin resistance ↘ Glucose disposition by insulin independent glucose transporters	
		Muscle function	2.5 years (males)	↗ Collagen concentration (=↗ fibrosis) ↘ Metalloproteases expression ↗ Metalloproteases inhibitor expression	
		Endocrinology	2-3 years (males)	↗ Leptin concentration	

IGF1: Insulin Growth Factor 1; IGFBP3: Insulin growth Factor Binding Protein 3; AMPK: AMP-activiated protein kinase; IGFBP2: Insulin growth Factor Binding Protein 2.

In order to understand the importance of preconceptional obesity, embryos produced in adult obese or control ewes were transferred in adolescent control or obese ewes (Wallace *et al.*, 2017). Pregnancy length was shorter in obese recipients and resulted in reduced lamb birthweight compared to controls, regardless of donor group. The colostrum quality was also affected by obesity (Wallace *et al.*, 2017).

Finally, in cattle, feeding with 125% requirements from 3 months of gestation increases calf birthweight but weaning weight and carcass quality at 5 months of age were not different between groups (Wilson *et al.*, 2016). Thus, excess maternal nutrition and maternal obesity both affect lipid and glucose metabolism in offspring and may also alter body composition and muscle quality.

Undernutrition

As for excess nutrition, maternal undernutrition has been extensively studied in the ewe (Table 2). Only severe maternal undernutrition reduces birthweight whereas moderate undernutrition appears un-noticed in terms of offspring birthweight (Bispham *et al.*, 2003; Gardner *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2014, 2016; Field *et al.*, 2015; Kleemann *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2016; Whorwood *et al.*, 2016). Nevertheless, lambs born to undernourished ewes have reduced plasma IGF1 and T3 (triiodothyronin) concentrations (Hoffman *et al.*, 2014; Field *et al.*, 2015) and physiological pathways involving corticosteroid hormones are disturbed (Whorwood *et al.*, 2016). Maternal undernutrition has also been associated with alterations in glucose metabolism, including hyperglycemia or hyperinsulinemia, increased insulin secretion by β-cells and reduced glucose tolerance (Gardner *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2016). Intra-muscular lipid depositions are also increased in these lambs together with modifications in muscular fiber development (Ford *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2014) and increased perirenal fat mass was observed with or without reduction of subcutaneous fat (Gardner *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2014, 2016).

In goats, a progressive maternal undernutrition (goats were fed 50 to 80% of the spontaneous intake of controls) in the last third of gestation reduced birthweight in male kids only although Non-esterified fatty Acid concentrations (NEFA) were increased in all kids (Laporte-Broux *et al.*, 2011). Subsequently at 1 and 2 years of age, restricted female offspring ate more than controls but no difference in energy metabolism was evidenced between groups (Laporte-Broux *et al.*, 2012).

In beef cattle, feeding cows at 80% requirements between 3 and 6 months of gestation reduced subcutaneous rib fat thickness and increased the intra- to inter-muscular fat ratio in 7 months old calves (Mohrhauser *et al.*, 2015). The birthweight of calves born to Angus cross-bred cows fed 60% of their requirements between 30 and 85 days or between 30 and 140 days of gestation was the same as offspring born to cows fed 100% of requirements but their liver was heavier (Prezotto *et al.*, 2016). Moreover, nutritional supplementation of restricted beef heifers during pregnancy did not increase offspring birthweight nor subsequent performance (Summers *et al.*, 2015) but increased feedlot efficiency and altered carcass characteristics with a tendency for high fat concentrations in the meat of animal born to restricted, non-supplemented heifers (Summers *et al.*, 2015).

In rabbits, a 50% maternal undernutrition from 7 to 19 days or from 20 to 27 days of gestation (31 days pregnancy) reduced pups' birthweight but post-natal growth, feeding behavior and body composition were not altered until 2,5 months of age (Lopez-Tello *et al.*, 2017).

Thus, whatever the species, although maternal undernutrition may not alter birthweight, offspring lipid and glucose metabolism are usually disturbed, affecting body composition and muscular development.

Effect of maternal metabolism

Independently from nutrition, maternal metabolism can be affected by many factors. Insulinoresistance is usually linked to obesity but can also be associated to production. Indeed, high yielding dairy cattle are prone to insulinoresistance because of their high energy requirements for milk production inducing a negative energy balance and this lactational insulinoresistance can persist for subsequent pregnancies (Bossaert *et al.*, 2008; De Koster and Opsomer, 2013; Zachut *et al.*, 2013; Opsomer *et al.*, 2017). Dairy cows insulinoresistant in late gestation produce lighter calves with reduced IGF1 plasma concentrations and increased insulinemia at birth (Kawashima *et al.*, 2016). Effects on subsequent offspring production have not been studied but epidemiological data indicate a slightly reduced milk yield if offspring from dams inseminated at peak lactation (González-Recio *et al.*, 2012).

Effect of maternal parity

The study of maternal age and parity on offspring development is difficult in production animals as age and parity are usually linked. Heifers are also non-lactating at breeding in contrast to cows.

In the horse, primiparous mares produce smaller and lighter foals at birth than multiparous mares (Fig. 2; Doreau *et al.*, 1991; Lawrence *et al.*, 1992; Pool-Anderson *et al.*, 1994; Cymbaluk and Laarveld, 1996; Wilsher and Allen, 2003; Elliott *et al.*, 2009; Klewitz *et al.*, 2015; Vazquez *et al.*, 2015; Meirelles *et al.*, 2017). Moreover, it has been shown that foals born to primiparous mares remain smaller until 1 year of age and lighter until 4 months of age compared with foals born to multiparous mares (Pool-Anderson *et al.*, 1994; Cymbaluk and Laarveld, 1996; Zoch *et al.*, 2016; Meirelles *et al.*, 2017). This difference of growth seems to be linked with decreased IGF-1 serum concentration in primiparous foals (Cymbaluk and Laarveld, 1996).

Table 2. Summary of studies performed on the effects of undernutrition in pregnant ewes on the post-natal development of the offspring. The level of undernutrition is expressed as a percentage of the energy content ingested by the control group.

Undernutrition	Undernutrition period	Function	Age	Phenotype	Source
Periconceptional undernutrition					
70%	From 17 days before insemination to 6 days after	Growth	Birth	= Live weight	Kleeman *et al*., 2015
			5 days	↗ Liver weight	
Undernutrition in early gestation					
50%	28 to 79 days of gestation	Growth	135 days of gestation	= Live weight	Field *et al*., 2015
50%	28 to 78 days of gestation	Growth	Birth	↘ Live weight	Ford *et al*., 2007
			From 4 to 8 months	↗ Live weight	
		Body condition	8 months	↗ Perirenal and muscle adipose tissue	
		Carbohydrate metabolism	2 months	↗ Basal glycaemia ↗ Pancreatic β cell response	
			8 months	↘ Pancreatic β cell response	
50%	28 to 77 days of gestation	Growth	Birth	= live weight, ↗ total length, ↗ kidneys weight	Whorwood *et al*., 2016
		Gene expression		↗ G*lucocorticoid receptor* expression (adrenal, liver, lung, perirenal adipose tissue, kidneys) ↘ *11- βHSD2 e*xpression (adrenals, kidneys)	
40%	28 to 80 days of gestation	Growth	Birth	↗ Live weight	Bispham *et al*., 2003
50%	30 to 80 days of gestation	Growth	Birth	= Live weight	Sen *et al*., 2016
			5 months	↘ Live weight	

Undernutrition	Undernutrition period	Function	Age	Phenotype	Source
Undernutrition in late gestation					
60%	From 116 days of gestation	Growth	1 day	↘ Live weight, ↘ thoracic perimeter	Hoffman *et al.,* 2014
			3 months	↘ Back subcutaneous adipose tissue thickness	
		Endocrinology	1 day	↘ T3 concentration	
			From 1 day to 3 months	↘ IGF1 concentration ↘ IGFBP3 concentration	
50%	From 110 days of gestation	Growth	From birth to 1 year	= Live weight	Gardner *et al*., 2005
		Carbohydrate metabolism	1 year	↘ Glucose tolerance ↘ GLUT4 expression in the perirenal adipose tissue	
		Body condition	1 year	↗ Fat mass	
50%	From 105 days of gestation	Growth	From birth to 6 months	↘ Live weight	Khanal et al., 2014
			6 months	↘ Subcutaneous adipose tissue / visceral adipose tissue ratio	
Undernutrition throughout gestation					
50%	From 28 days of gestation	Growth	135 days of gestation	= Live weight, ↗ liver weight	Field *et al*., 2015
		Carbohydrate metabolism		↗ Umbilical insulinemia	
		Endocrinology		↗ Umbilical IGF1 concentration	
60%	From 31 days of gestation	Growth	From 1 day to 3 months	= Live weight, total length	Reed *et al*., 2014 Hoffman *et al*., 2016
			3 months	↗ Heart weight	
		Body condition	3 months	↘ Back subcutaneous adipose tissue thickness	
		Carbohydrate metabolism	3 months	↗ Basal insulinemia ↗ Basal insulin/glucose ratio	
		Muscle function	1 day	↗ Fibres area (cross section)	
			3 months	↘ Fibres area (cross section)	
			From 1 day to 3 months	↗ Lipid accumulation in muscle	

11-βHSD: 11β-hydroxusteroid dehydrogenase : converts cortison into cortisone; T3: Triiodothyronine; IGF1: Insulin Growth Factor 1; IGFBP3: Insulin growth Factor Binding Protein 3; GLUT4: Glucose transporter 4.

In dairy cattle, heifers have a shorter gestation length and produce smaller (-9%) and lighter calves compared to cows (Kertz *et al.*, 1997; Kamal *et al.*, 2014, 2015) with a reduced body mass index (weight/ withers' heigth * crown-rump length) at birth (Kamal *et al.*, 2014, 2015). Nevertheless, alterations of the glucose metabolism were not observed at birth in these calves (Kamal *et al.*, 2015). Finally, heifers' colostrum contains less calcium, phosphorus and magnesium than multiparous cow colostrum, indicating that colostrum quality is altered, maybe for other components (Kume and Tanabe, 1993).

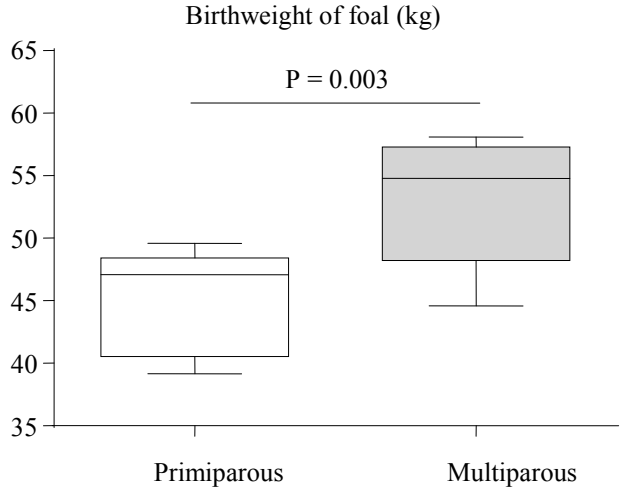


Figure 2. Birthweight of foals depending on the parity of the mare. Data derived from Doreau *et al*. (1991); Lawrence *et al*. (1992); Wilsher and Allen (2003); Elliott *et al*. (2009); Meirelles *et al*. (2017).

Practical implications for embryo transfer

The data presented above show clear evidence that maternal size and nutrition may influence offspring size but also metabolism and production. Other production and health traits, such as immunity, feeding behavior but also fertility may also be affected (Chadio and Kotsampasi, 2014; Chavatte-Palmer *et al.* 2014). This pleads for a very careful choice of embryo recipients in terms of breed and size but also underlines the importance of the management of these animals before and during pregnancy. The molecular basis for these effects is epigenetic mechanisms (Gonzalez-Recio *et al*., 2015; Triantaphyllopoulos *et al.*, 2016). Future research is needed to explore if epigenetic markers could be used as predictors of long term outcomes in offspring.

References

Allen W, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield R. 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III postnatal growth. *Reproduction,* 127:67-77.

Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP. 1999. The impacts of uterine environment and fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in pigs. *J Anim Sci,* 77:954-959.

Bispham J, Gopalakrishnan GS, Dandrea J, Wilson V, Budge H, Keisler DH, Pipkin FB, Stephenson T, Symonds ME. 2003. Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: Consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology,* 144:3575-3585.

Bossaert P, Leroy J, Vliergher S, Opsomer G. 2008. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci,* 91:3363-3371.

Chadio S, Kotsampasi B. 2014. The role of early life nutrition in programming of reproductive function. *J Dev Orig Health Dis*, 5:2-15.

Chavatte-Palmer P, Debus N, Dupont,C, Camous S. 2014. Nutritional programming and the reproductive function of the offspring. *Anim Prod Sci*, 54:1166-1176.

Chavatte-Palmer P, Richard C, Peugnet P, Robles M, Rousseau-Ralliard D, Tarrade A. 2015. The developmental origins of health and disease: importance for animal production. *Anim Reprod Sci,* 12:505-520.

Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D. 2016. Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. *Int J Environ Res Public Health,* 13:E586. doi: 10.3390/ijerph13060586.

Cymbaluk N, Laarveld B. 1996. The ontogeny of serum insulin-like growth factor-I concentration in foals: effects of dam parity, diet, and age at weaning. *Domest Anim Endocrinol,* 13:197-209.

Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. 2003. Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. *Placenta*, 24:248-257.

De Koster JD, Opsomer G. 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract,* 29:299-322.

Doreau M, Boulot S, Martin-Rosset W. 1991. Effect of parity and physiological state on intake, milk production and blood parameters in lactating mares differing in body size. *Anim Prod,* 53:111-118.

Elliott C, Morton J, Chopin J. 2009. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology,* 71:683-689.

Evans AC, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Ireland JJ. 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Domest Anim*, 47(suppl. 4):31-37.

Ferrell CL. 1991. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *J Anim Sci,* 69:1945-1953.

Field ME, Anthony R V., Engle TE, Archibeque SL, Keisler DH, Han H. 2015. Duration of maternal undernutrition differentially alters fetal growth and hormone concentrations. *Domest Anim Endocrinol,* 51:1-7.

Ford SP, Hess BW, Schwope MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H, Nathanielsz PW. 2007. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *J Anim Sci*, 85:1285-1294.

Funston RN, Summers AF, Roberts AJ. 2012. Alpharma Beef Cattle Nutrition Symposium: implications of nutritional management for beef cow-calf systems. *J Anim Sci*, 90:2301-2307.

Gardner D, Tingey K, Van Bon B, Ozanne S, Wilson V, Dandrea J, Keisler D, Stephenson T, Symonds M. 2005. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,* 289:947-954.

González-Recio O, Ugarte E, Bach A. 2012. Trans-generational effect of maternal lactation during pregnancy: a Holstein cow model. *PLoS One,* 7:e51816.

Gonzalez-Recio O, Toro MA, Bach A. 2015. Past, present, and future of epigenetics applied to livestock breeding. *Front Genet*, 6:305. doi: 10.3389/fgene.2015.00305.

Hoffman ML, Rokosa MA, Zinn SA, Hoagland TA, Govoni KE. 2014. Poor maternal nutrition during gestation in sheep reduces circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in offspring. *Domest Anim Endocrinol,* 49:39-48.

Hoffman ML, Peck KN, Forella ME, Fox AR, Govoni KE, Zinn SA. 2016. The effects of poor maternal nutrition on postnatal growth and development of lambs. *J Anim Sci*, 94:789-799.

Huang Y, Zhao JX, Yan X, Zhu MJ, Long NM, McCormick RJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. 2012. Maternal obesity enhances collagen accumulation and cross-linking in skeletal muscle of ovine offspring. *PLoS One,* 7:1-8.

Joubert D, Hamond J. 1958. A crossbreeding experiment with cattle, with special reference to maternal effect in South Devon-Dexter crosses. *J Agric Sci*, 51:325-341.

Kamal MM, Van Eetvelde M, Depreester E, Hostens M, Vandaele L, Opsomer G. 2014. Age at calving in heifers and level of milk production during gestation in cows are associated with the birth size of Holstein calves. *J Dairy Sci,* 97:5448-5458.

Kamal MM, Van Eetvelde M, Bogaert H, Hostens M, Vandaele L, Shamsuddin M, Opsomer G. 2015. Environmental factors and dam characteristics associated with insulin sensitivity and insulin secretion in newborn Holstein calves. *Animal,* 9:1490-1499.

Kawashima C, Munakata M, Shimizu T, Miyamoto A, Kida K, Matsui M. 2016. Relationship between the degree of insulin resistance during late gestation and postpartum performance in dairy cows and factors that affect growth and metabolic status of their calves. *J Vet Med Sci,* 78:739-745.

Kertz AF, Reutzel LF, Barton BA, Ely RL. 1997. Body weight, body condition score, and wither height of prepartum holstein cows and birth weight and sex of calves by parity: a database and summary. *J Dairy Sci,* 80:525-529.

Khanal P, Husted SV, Axel AMD, Johnsen L, Pedersen KL, Mortensen MS, Kongsted AH, Nielsen MO. 2014. Late gestation over- and undernutrition predispose for visceral adiposity in response to a post-natal obesogenic diet, but with differential impacts on glucose-insulin adaptations during fasting in lambs. *Acta Physiol,* 210:110-126.

Kleemann DO, Kelly JM, Rudiger SR, McMillen IC, Morrison JL, Zhang S, MacLaughlin SM, Smith DH, Grimson RJ, Jaensch KS, Brien FD, Plush KJ, Hiendleder S, Walker SK. 2015. Effect of periconceptional nutrition on the growth, behaviour and survival of the neonatal lamb. *Anim Reprod Sci,* 160:12-22.

Klewitz J, Struebing C, Rohn K, Goergens A, Martinsson G, Orgies F, Probst J, Hollinshead F, Bollwein H, Sieme H. 2015. Effects of age, parity, and pregnancy abnormalities on foal birth weight and uterine blood flow in the mare. *Theriogenology*, 83:721-729.

Kume S, Tanabe S. 1993. Effect of parity on colostral mineral concentrations of Holstein cows and value of colostrum as a mineral source for newborn calves. *Journal of dairy science*, 76:1654-1660.

Laporte-Broux B, Roussel S, Ponter A, Perault J, Chavatte-Palmer P, Duvaux-Ponter C. 2011. Short-term effects of maternal feed restriction during pregnancy on goat kid morphology, metabolism, and behavior. *J Anim Sci,* 89:2154-2163.

Laporte-Broux B, Roussel S, Ponter A, Giger-Reverdin S, Camous S, Chavatte-Palmer P, Duvaux-Ponter C. 2012. Long-term consequences of feed restriction during late pregnancy in goats on feeding behavior and emotional reactivity of female offspring. *Physiol Behav,* 106:178-184.

Lawrence L, DiPietro J, Ewert K, Parrett D, Moser L, Powell D. 1992. Changes in body weight and condition of gestating mares. *J Equine Vet Sci*, 12:355-358.

Long NM, George LA, Uthlaut AB, Smith DT, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. 2010. Maternal obesity and increased nutrient intake before and during gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in adult offspring. *J Anim Sci,* 88:3546-3553.

Long NM, Rule D, Tuersunjiang N, Nathanielsz P,

Ford S. 2015. Maternal obesity in sheep increases fatty acid synthesis, upregulates nutrient transporters, and increases adiposity in adult male offspring after a feeding challenge. *PLoS One*, 10:e0122152.

Lopez-Tello J, Arias-Alvarez M, Jimenez-Martinez M-A, Garcia-Garcia R-M, Rodriguez M, Lorenzo Gonzalez P, Bermejo-Poza R, Gonzalez-Bulnes A and Garcia Rebollar P. 2017. Competition for materno-fetal resource partitioning in a rabbit model of undernourished pregnancy. *PLoS One*, 12:e0169194.

Meirelles MG, Veras MM, Alonso MA, de Fátima Guimarães C, Nichi M, Fernandes CB. 2017. Influence of maternal age and parity on placental structure and foal characteristics from birth up to two years of age. *J Equine Vet Sci,* 56:68-79.

Mohrhauser DA, Taylor AR, Underwood KR, Pritchard RH, Wertz-Lutz AE, Blair AD. 2015. The influence of maternal energy status during midgestation on beef offspring carcass characteristics and meat quality. *J Anim Sci,* 93:786-793.

Opsomer GA, Van Eetvelde M, Kamal MA, Van Soom A. 2017. Epidemiological evidence for metabolic programming in dairy cattle. *Reprod Fertil Dev,* 29:52-57.

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

Peugnet P, Mendoza L, Wimel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, Caudron I, Deliège B, Toquet M-P, Richard E, Chaffaux S, Tarrade A, Lejeune J-F, SerteynD, Chavatte-Palmer P. 2016. Longitudinal study of growth and osteoarticular status in foals born to between-breed embryo transfers. *J Equine Vet Sci,* 37:24-38.

Philp LK, Muhlhausler BS, Janovska A, Wittert GA, Duffield JA, McMillen IC. 2008. Maternal overnutrition suppresses the phosphorylation of 5'-AMP activated protein kinase (AMPK) in liver, but not skeletal muscle, in fetal and neonatal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295:1982-1990.

Pillai S, Jones A, Hoffman M, McFadden K, Reed S, Zinn S, Govoni, K. 2017. Fetal and organ development at gestational days 45, 90, 135 and at birth of lambs exposed to under- or over-nutrition during gestation. *Translational Animal Science*, 1:16-25.

Pool-Anderson L, Raub R, Warren J. 1994. Maternal influences on growth and development of full-sibling foals. *J Anim Sci,* 72:1661-1666.

Prezotto LD, Camacho LE, Lemley CO, Keomanivong FE, Caton JS, Vonnahme KA, Swanson KC. 2016. Nutrient restriction and realimentation in beef cows during early and mid-gestation and maternal and fetal hepatic and small intestinal in vitro oxygen consumption. *Animal*, 10:1-9.

Reed SA, Raja JS, Hoffman ML, Zinn SA, Govoni KE. 2014. Poor maternal nutrition inhibits muscle development in ovine offspring. *J Anim Sci Biotechnol*, 5:43. doi: 10.1186/2049-1891-5-43.

Sen U, Sirin E, Ensoy U, Aksoy Y, Ulutas Z, Kuran M. 2016. The effect of maternal nutrition level during mid-gestation on postnatal muscle fibre composition and meat quality in lambs. *Anim Prod Sci,* 56:834-843.

Sinclair KD, Rutherford KMD, Wallace JM, Brameld JM, Stöger R, Alberio R, Sweetman D, Gardner DS, Perry VEA, Adam CL, Ashworth CJ**,** Robinson JE**,** Dwyer CM. 2016. Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals. *Reprod Fertil Dev*, 28:1443-1478.

Summers AF, Meyer TL, Funston RN. 2015. Impact of supplemental protein source offered to primiparous heifers during gestation on I. Average daily gain, feed intake, calf birth body weight, and rebreeding in pregnant beef heifers. *J Anim Sci,* 93:1865-1870.

Tischner M. 2000. Maternal influence on pre- and postnatal growth of foals born after embryo transfer. *J Reprod Fertil Suppl*, 56:705-708.

Triantaphyllopoulos KA, Ikonomopoulos I and Bannister AJ. 2016. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. *Epigenetics Chromatin* 9:31. doi: 10.1186/s13072-016-0081-5.

Vazquez J, Esteller-Vico A, Irizarri A, Liu I, Troedsson M. 2015. Influence of stallion, donor and recipient mare's height and parity in foal height from birth to three years old in an embryo transfer program. A retrospective study. *In*: Proceedings of the 4th International Congress of the World Equine Veterinary Association (WEVA), 2015, Guadalajara, Mexico. Guadalajara: WEVA.

Wallace J, Milne J, Adam C, Aitken R. 2017. Impact of donor and recipient adiposity on feto-placental growth in adolescent sheep. *Reproduction*, 153:381-394.

Walton A, Hammond J. 1938. The maternal effects on growth and conformation in Shire horse-Shetland pony crosses. *Proc R Soc London*, 125:311-335.

Whorwood CB, Firth KM, Budge H, Symonds ME. 2016. Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11-hydroxysteroid receptor in neonatal sheep. *Endocrinology*, 142:2854-2864.

Wilsher S, Allen W. 2003. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Vet J*, 35:476-483.

Wilson TB, Faulkner DB and Shike DW. 2016. Influence of prepartum dietary energy on beef cow performance and calf growth and carcass characteristics. *Livest Sci,* 184:21-27.

Zachut M, Honig H, Striem S, Zick Y, Boura-Halfon S, Moallem U. 2013. Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *J Dairy Sci,* 96:5656-5669.

Zhang L, Long N, Hein S, Ma Y, Nathanielsz, Ford S. 2012. Maternal obesity in the ewe results in reduced fetal pancreatic β-cell numbers in late gestation, and decreased circulating insulin concentration at term. *Domest Anim Endocrinol,* 40:30-39.

Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. 2016. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone,* 82:42-49.

Revue 2 : Developmental programming in equine species: relevance for the horse industry

Pascale Chavatte-Palmer, Pauline Peugnet, **Morgane Robles**

Animal Frontiers, 2017, 7:48-54
DOI: 10.2527/af.2017-0128

Published online July 6, 2017

Developmental programming in equine species: relevance for the horse industry

Pascale Chavatte-Palmer, Pauline Peugnet, and Morgane Robles

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

Implications

- Broodmare nutrition, in particular the use of concentrated feed, could affect the foal's metabolic and joint health, inducing lameness and reducing sport performance.
- Embryo biotechnologies are widely used in the horse industry. The choice and nutrition of the surrogate dam partly determines the adult size and health of the offspring.
- Better broodmare nutrition may be an easy and cheap means of preventing joint diseases.
- Equine obesity and metabolic diseases are raising concerns for veterinarians. There is a need for better nutrition of horses, in particular in mares during gestation.

Key words: DOHaD, foal, mare, osteochondrosis, pregnancy

Introduction

Economic importance of the horse industry

According to statistics collected by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (www.fao.org/faostat/en/), the worldwide population of horses was estimated at 58 million head in 2014, of which 55.2% are located in the Americas (with a third in North America), 24.3% in Asia, 10.3% in Africa, and 9.4% in Europe. This population is heterogeneous depending on continents, but the percentage of horses dedicated to leisure and sport activities is steadily increasing in westernized countries. In Europe, the equine sector provides 400,000 full-time jobs, generating revenue above €100 billion annually, and the number of horse riders increases by 5% per year (http://www.europeanhorsenetwork.eu/the-horse-industry/).

Athletic performance and use of horses

Horses are mainly used for sport or work. Athletic performance in horses is the result of multiple variables, including genetics, health, training, temperament, nutrition, and rider's ability. Osteoarticular health is of uppermost importance. One major burden for the breeding industry is osteochondrosis, a perturbation in cartilage ossification that affects up to 44% of young horses and reduces their ability to compete (Verwilghen et al., 2013). Osteochondrosis is known to be due to both genetic and environmental factors.

Depending on the equestrian sport, horse careers differ. For example, Thoroughbreds compete in flat-racing when they are still growing, as many top-ranking races are devoted to 3-yr olds. In other sports, such as show jumping, the sport career may be long and intensive, up to 15 to 20 yr of age. Reproductive use takes place either after the sports careers or in combination with performance through semen freezing in males and embryo transfer in females. Alternatively, when horses are kept for leisure, they are often considered as companion animals, given relatively little exercise and kept until old age.

Developmental origins of health and disease and epigenetics

In mammals, developmental conditions (e.g., maternal nutrition, stress, or exposure to pollution) at the time of conception or during pregnancy and the neonatal period are known to affect long-term postnatal health, and are referred to as "Developmental Origins of Health and Disease" (**DOHaD**). Non-communicable diseases such as diabetes (perturbation of the glucose metabolism), obesity, and cardiovascular diseases, but also neurological and osteoarticular disorders, have been shown to have developmental roots.

The biological basis for DOHaD is epigenetic mechanisms that are induced by modifications of the cellular environment. The epigenetic machinery modifies the expression of genes without altering the DNA structure of the genes, either by hampering or enabling the access of transcription factors to the DNA, or by acting at the post-transcriptional level (i.e., after the genes have been translated into molecules conveying the information to the cellular machinery; Jammes et al., 2011). Although they are reversible, epigenetic marks are maintained with cell division. They are considered as the "memory of the cell" and can induce physiological effects a very long time after the event that caused them occur took place (Figure 1). The prenatal and early postnatal periods are considered as critical periods because the epigenetic plasticity of developing organism makes it very sensitive to its environment.

Scope of the article

Thus, in the equine species, maternal environment, such as broodmare metabolism and nutrition, or the use of reproductive biotechnologies, may affect feto-placental development, foal growth, and subsequent adult health, thus impacting offspring performance and longevity.

This article aims to summarize existing knowledge on long-term effects of breeding conditions and reproductive biotechnologies in the equine species, with special reference to their unique use as performers. Future directions both in research and for improvement of field management are discussed.

© Chavatte-Palmer, Peugnet, and Robles.
doi:10.2527/af.2017-0128

Maternal Nutrition

The first environmental factor that could affect fetal development and long-term offspring development is the nutrition of the dam.

Nutritional needs during gestation: Seasonal adaptations

The horse being a seasonal mammal, pregnancy usually starts in mid-spring and lasts 11 mo. In feral conditions, horses depend on vegetation availability for feeding throughout the year, with subsequent seasonal variations in body condition (higher in summer and lower in winter; Kuntz et al., 2006; Dawson and Hone, 2012). Thus, pregnant mares in early gestation (spring and early summer) have access to abundant resources and can store energy. In mid-pregnancy (late autumn and winter), food availability is reduced, and mares use their reserves to support fetal growth (Figure 2), with the foal gaining more than 50% of its birthweight in the last 3 mo of pregnancy. Nevertheless, most nutritional recommendations advise to feed domestic broodmares at maintenance levels until 5 mo of pregnancy and to subsequently increase feed energy levels to account for increased fetal demands (National Research Council, 2007; Martin-Rosset, 2012).

Breeders practice

Data regarding broodmare nutrition in the field are scarce. In Europe, late-gestation mares are generally fed 10 to 40% above nutritional recommendations for their gestational age (Bergero et al., 2006; Winkelsett et al., 2006), and even in pasture, mares often are most of the time supplemented with cereal concentrates (Jouven et al., 2013; Van der Heyden et al., 2013).

Broodmare nutrition can affect offspring health: Scientific evidence

Although maternal nutritional restriction or excess does not seem to affect foal weight at birth, except in cases of extreme undernutrition, glucose metabolism and osteoarticular development of the foal may be affected by inadequate maternal nutrition (Peugnet et al., 2016).

Epidemiological observations in the Belgian Ardennes showed that foals born to dams fed concentrated feed during pregnancy were eight times more likely to develop lesions of osteochondrosis compared with foals born to dams fed forage only (Figure 3; Van der Heyden et al., 2013). These data were confirmed in a controlled study using Saddlebred mares fed forage only or forage and concentrates although the difference in the incidence of osteochondrosis was not as large as in the epidemiological study, possibly because of the limited number of experimental animals (Peugnet et al., 2015). Foals born to dams fed forage only, however, had thinner cannon bones, were less efficient in regulating their blood glucose,

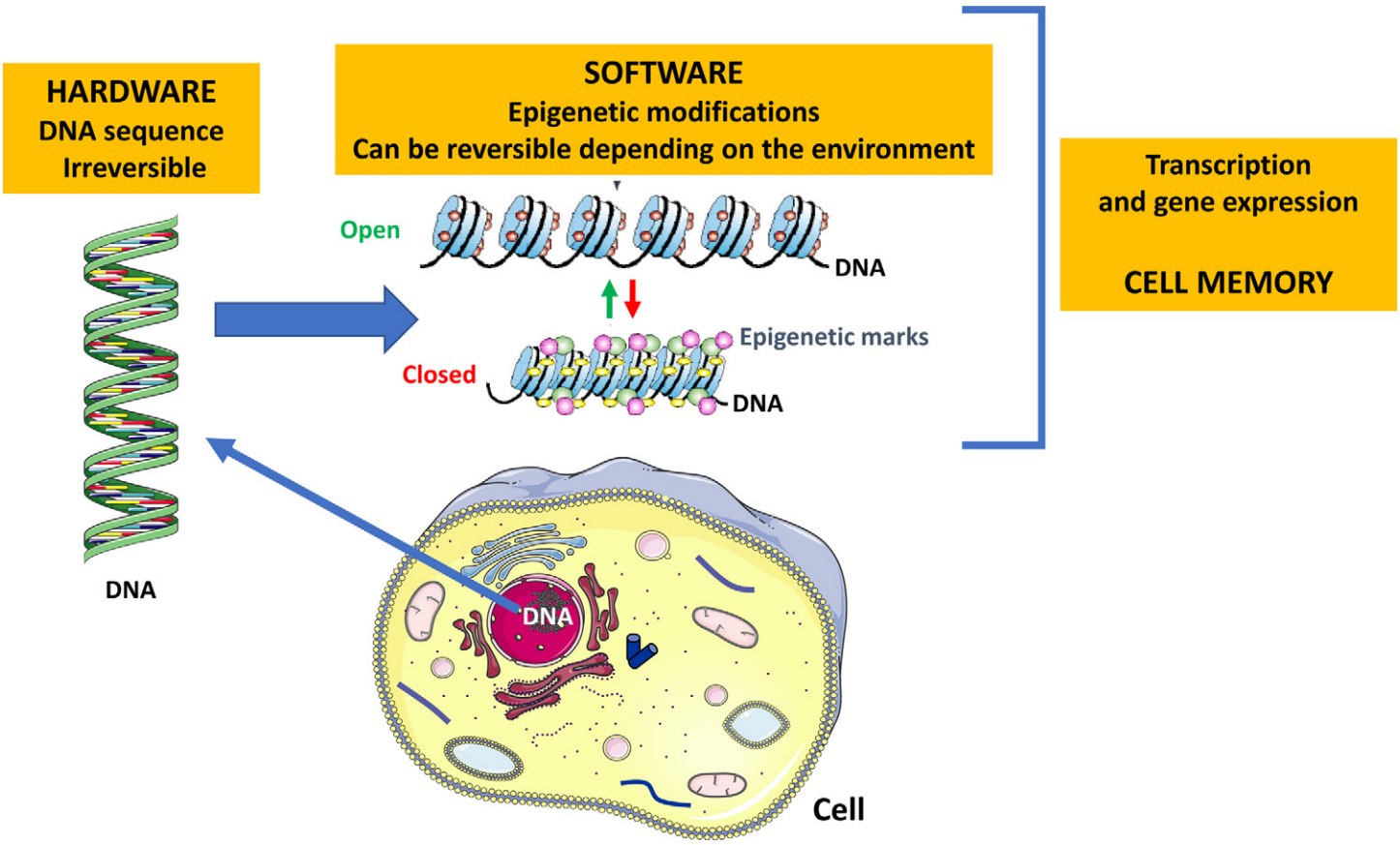


Figure 1. The concept of epigenetics. The genetic information is based on the double helix of DNA of the chromosomes located in the cell nucleus. This information could be considered as the hardware of the cell and is irreversible. Epigenetic mechanisms alter the expression of the genes coded by the DNA through mechanisms opening or closing the double DNA helix, thus controlling access of transcription factors to the DNA, or by post-transcriptional modifications. The epigenetic marks are reversible depending on the environment, but some may also persist throughout the life of an individual. They could be considered as the software controlling gene expression. Both genetic information and epigenetic mechanisms contribute to gene expression in the cell, with epigenetic marks contributing to the memory of the cell.

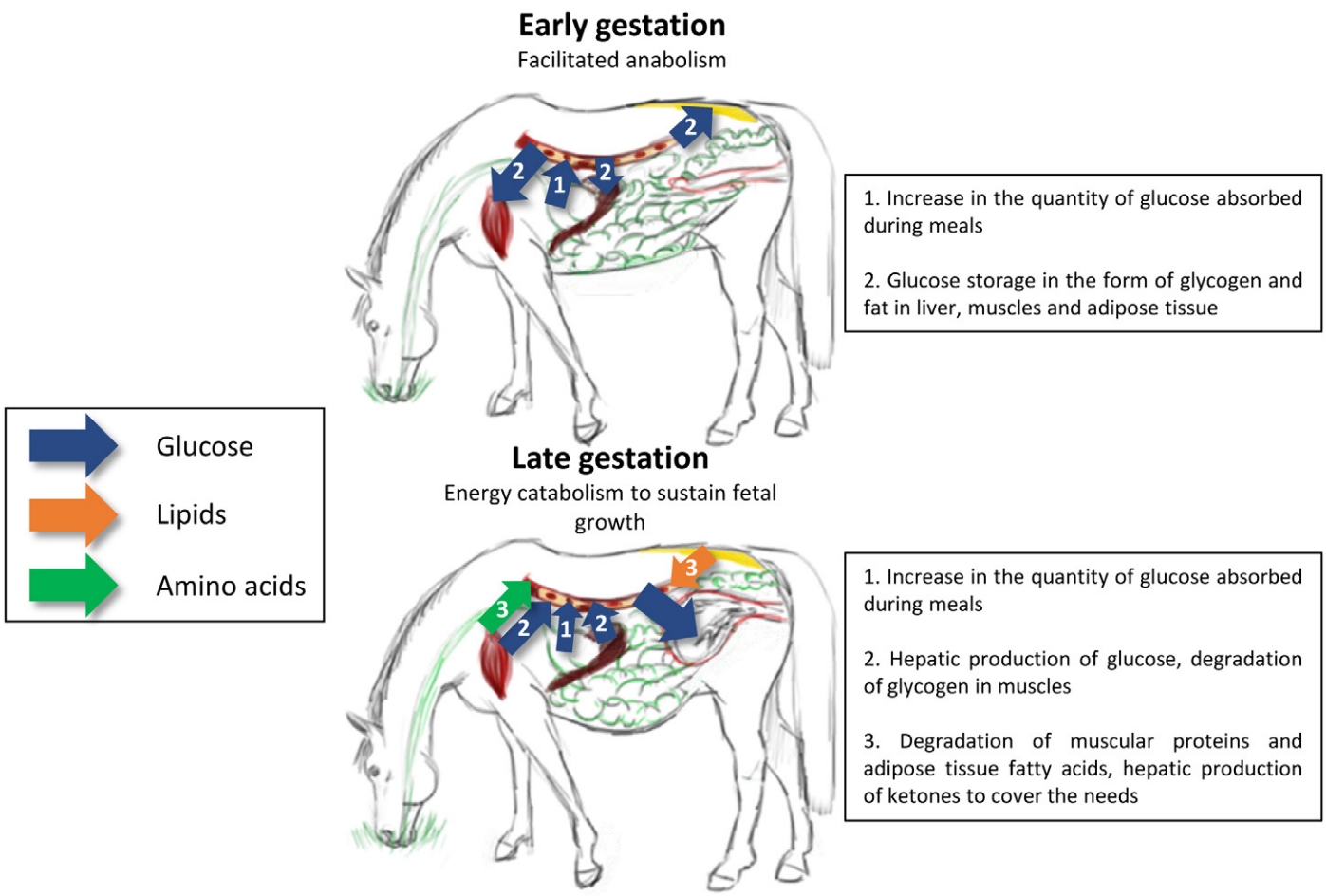


Figure 2. Physiological evolution of the mare's metabolism during gestation.

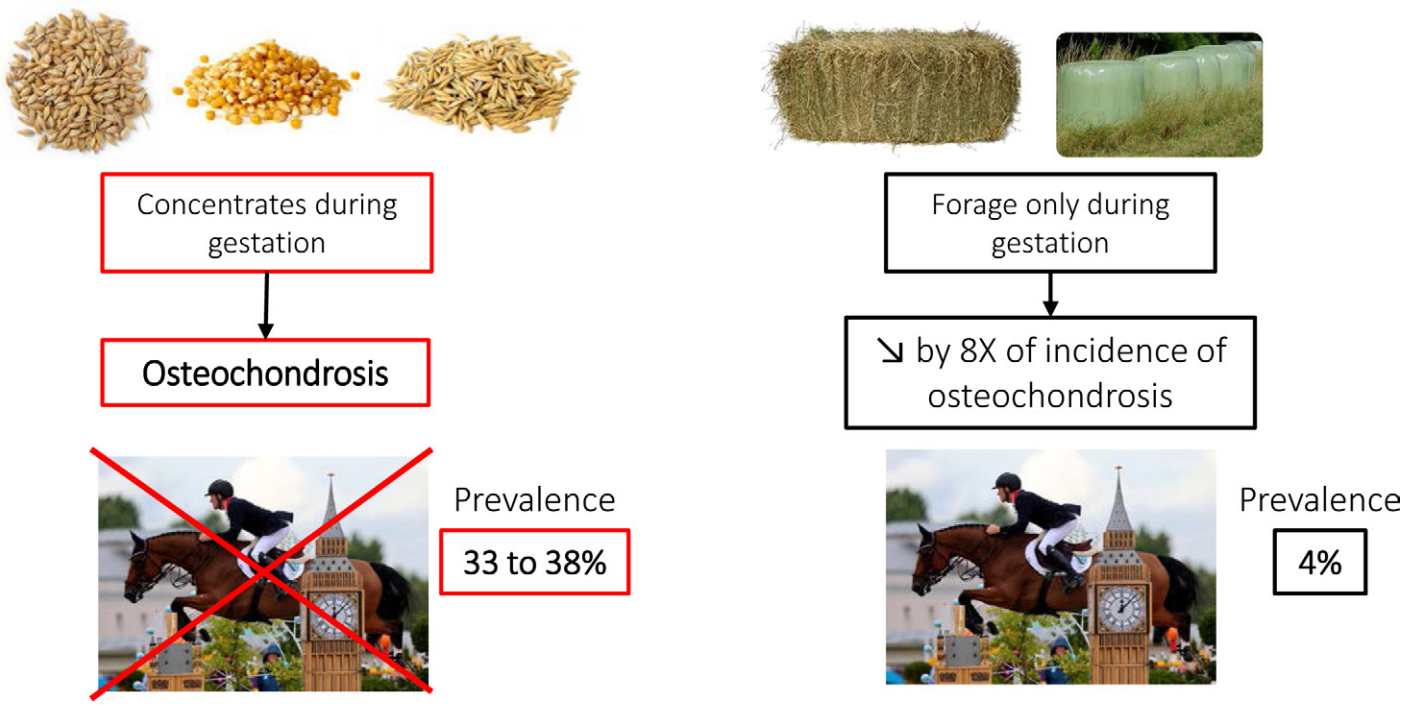


Figure 3. Differences in the incidence of osteochondrosis–a debilitating articular disease affecting young horses–in foals according to maternal nutrition (after Van der Heyden et al., 2013).

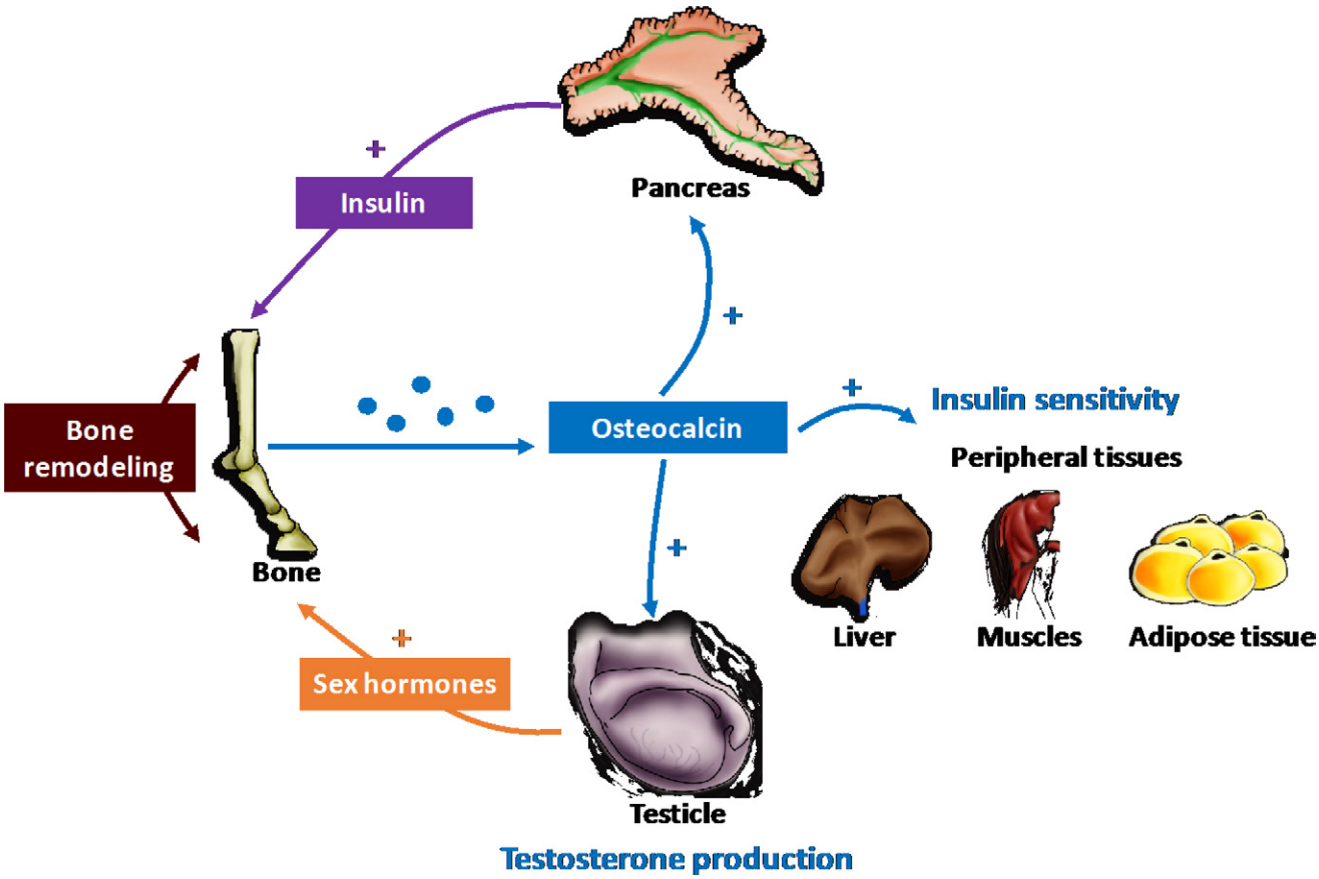


Figure 4. Cross-talk among pancreas, bones, testicle, and peripheral tissues through hormonal secretions of insulin, osteocalcin, and testosterone (adapted from Confavreux et al., 2009). Energy metabolism is closely linked to bone metabolism and testicular function, which can help explain the multiple consequences of adverse metabolic programming. Insulin, secreted by the pancreas, stimulates bone remodeling and synthesis of the osteocalcin hormone. Osteocalcin is central to the cross talk between different organs. In a positive feedback to the pancreas, osteocalcin stimulates insulin production. Osteocalcin also increases insulin sensitivity of target organs (liver, muscle, and adipose tissue) through its action on adiponectin secretion by adipose tissue. The adipokines (circulating factors such as leptin and adiponectin) secreted by the adipose tissue also have complex, direct, and indirect actions on bone growth and bone remodeling. Finally, osteocalcin also stimulates the maturation of testicular interstitial cells (Leydig cells) and increases the testicular production of steroid hormones (testosterone and estrogens) that, in return, stimulate bone accretion and regulate growth.

and had delayed testicular maturation compared with those born to dams fed forage and concentrates (Robles et al., 2017).

Biological basis for the concomitant effects on glucose metabolism, bone growth, and testicular development

The data described above show that altering nutrition in pregnant mares can induce effects in the foal on glucose homeostasis and bone and testicular development, most probably as a result of the cross-talk between energy, bone and testicular, or ovarian metabolism (Confavreux et al., 2009; Figure 4). Indeed, organs such as pancreas, bone, fat, and sexual organs (testicles and ovaries) communicate and regulate each other's function though the secretion of hormones (insulin, osteocalcin, adipokines, and sex steroids being among the key factors). Thus, any dysfunction in one organ may affect the whole system.

Although the exact inter-relation between these organs has not yet been described in fetal life, the occasional observations of osteochondrosis lesions in newborn foals already confirm the prenatal roots for this multifactorial disease (Olstad et al., 2007). Moreover, since testicular and ovarian development takes place in utero in horses, like in most domestic species, effects on testicles may also be due to prenatal developmental conditions. It is, however, important to underline that the quality and quantity of maternal lactation and the exercise of the foal have not been analyzed in the currently available models, and that they may have an important role in modulating the post-natal effects.

Consequences for the industry

The economic burden of osteochondrosis on the industry is related to the cost and length of treatment (surgery is needed in the most advanced stages of the disease) and the sportive consequences such as delayed training and poorer performance (Verwilghen et al., 2013) but also the refusal of certain studbooks to accept horses affected by this condition. The systematic rejection of stallions affected by the disease as registered stallions did not enable a significant reduction in the incidence of the disease. This is possibly due to the fact that some horses are operated on and the clinical signs of osteochondrosis removed before they are registered as breeders but also as a result of the multifactorial origin of the disease. Improving maternal nutrition may be one of the so far unexplored ways to prevent this condition. It is also relatively inexpensive compared with costly surgical treatment.

Moreover, experimental observations show that metabolism, bone strength as assessed by cannon bone width, as well as reproductive function could be affected by maternal nutrition as demonstrated in other species. Proper glucose metabolism is essential for performance as glu-

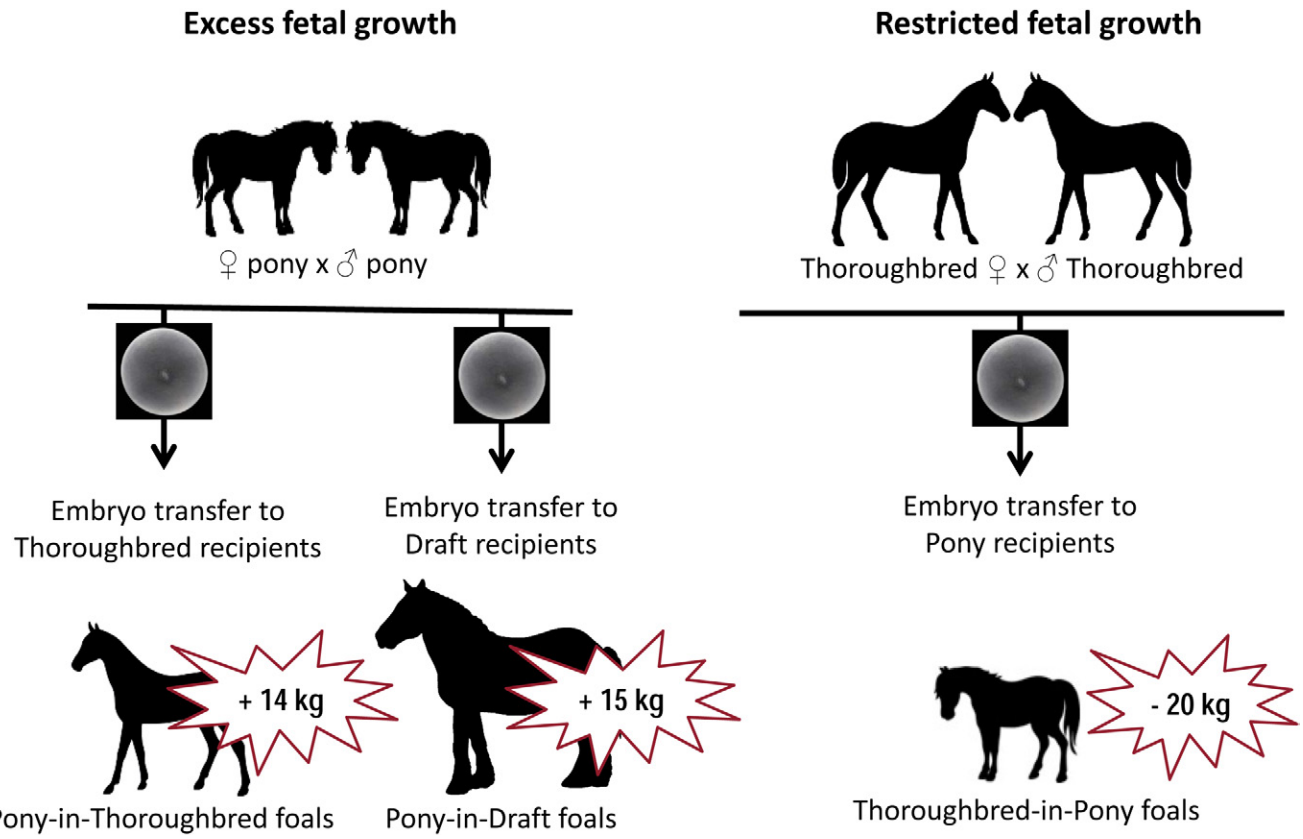


Figure 5. Models of embryo transfer between breeds of unlike size demonstrate that foal birth weight is related to maternal size (after Allen et al., 2004 and Peugnet et al., 2014).

cose is the major provider of energy during exercise. Several studies indicate that metabolic diseases in horses reduce the individual's performance and increase veterinary costs to the owner (Kearns et al., 2002).

The solidity of cannon bones is also important for sports such as steeple-chase and show jumping where the combined weight of the horse and its rider at reception are supported by the front legs. Finally, high-performing horses may be used for reproduction until 20 yr of age, and the maintenance of their fertility is an important concern.

Periconceptional Development and Embryo Biotechnologies

Scientific context

The pre- and/or periconceptional periods (before and just after fertilization until the embryo blastocyst stage) are critical for DOHaD (Steegers-Theunissen et al., 2013; Sinclair and Watkins, 2014). Deep epigenetic modifications occur during the development of the gametes (spermatozoa and eggs), fertilization, and the early stages of embryonic development. These modifications can be altered by the environment in vivo, in particularly through maternal and/or paternal nutrition, but also in vitro, in the context of Assisted Reproductive Technologies (**ART**) (Chavatte-Palmer et al., 2016).

Use of reproductive technologies in horses

In horses, the use of ART depends on the breed used. The Jockey Club, in charge of the Thoroughbred studbook, demands that all foals are born after natural breeding of their dams. Trotter breeds such as the French "Trotteur Français" accept that artificial insemination is used, but both the mare and the stallion need to be present on the farm. This enables a wider use of stallions as the collected sperm can be used for several mares. Most other breeds will accept foals that are born after insemination of the dam with shipped semen (enabling the dissemination of genetics) or after embryo transfer (the embryo of the genetic mother is transferred to a surrogate dam). So far, only a limited number of studbooks will register cloned foals.

To date, the most popular embryo technology in the equine species is embryo transfer, which involves the collection of one embryo from a donor mare that is transferred immediately or after shipping in conservation medium (24 to 48 h) into a recipient mare. The International Embryo Transfer Society reported that more than 20,000 in vivo produced equine embryos were transferred worldwide in 2015 (Perry, 2016). Although procedures such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and ICSI followed by in vitro embryo culture (ICSI-C) as well as cloning are now developed in the industry (Galli et al., 2014; Hinrichs et al., 2014), the number of foals born from these procedures remains very limited (around 1,000 foals/year worldwide).

Effects of the size of surrogate dams

The ability for an individual to reach its genetic potential in terms of adult size partially depends on the size of its dam, as elegantly demonstrated by Walton and Hammond (1938) in the first half of the 20th century using cross-breeding between large Shire horses and small Shetland ponies. Crossbred offspring whose dam was a Shetland pony were smaller at birth and remained smaller as adults than those whose dam was a Shire mare. Almost 50 yr later, Polish pony embryos transferred into draft mares

were shown to produce foals that were larger at birth and remained larger as adults compared with those that had been transferred into mares of their own breed (Tischner, 2000). These data have been confirmed more recently by two independent studies using embryo transfer between breeds of different sizes as a model (Figure 5). The transfer of pony embryos into mares of larger breeds consistently increased fetal growth, and excess size was maintained until adulthood. In contrast, foals from a larger breed born to pony mares were small at birth and only partially caught up to controls of the same breed (Allen et al., 2004; Peugnet et al., 2014). Moreover, excess or reduced fetal growth was associated with abnormalities in the regulation of blood pressure at birth as well as metabolic perturbations that could persist up to 2 yr of age (Peugnet et al., 2016). Of particular interest for the athletic performance of the young horse, the risk of developing lesions of osteochondrosis was increased at 6 mo of age. Osteochondrosis has been associated with greater plasma glucose and insulin concentrations after the meals (indicating a less efficient control of glucose metabolism) in young horses, and thus these observations may be related to the metabolic dysfunction.

Effect of embryo biotechnologies

In horses, so far, no adverse effects of embryo transfer, ICSI, ICSI-C, and cloning on postnatal growth and adult health have been reported in horses (McKinnon and Squires 2009; Johnson et al., 2010, Galli et al., 2014; Hinrichs et al., 2014).

Consequences for the industry

In commercial embryo transfer units, surrogate dams are usually chosen for their breeding soundness, maternal abilities, and low cost. Alternatively, the client may also impose the choice of the recipient mare to reduce costs and for personal convenience. Although extreme size differences between the embryo and recipient genetics are rarely encountered, small differences (such as the transfer of embryos of large show jumping breeds into smaller size Quarter Horse mares) are common. Consequences of the effects on metabolism and osteochondrosis have been discussed with maternal nutrition.

Differences in adult size induced by embryo transfer may jeopardize the registration in a studbook as size limits are imposed. On the other hand, breeders may take advantage of these mechanisms. For example, registration in a pony breed and access to pony competitions depend on the animal size: choosing a smaller recipient mare may help to ensure that the offspring of a larger individual remains suitable for registration as a pony. To date, consequences of these observations on further performance remain to be determined although a few studies indicate that smaller size is associated with poorer prices at Thoroughbred yearling sales (Pagan et al., 2005) and poorer racing performance in Thoroughbreds (Smith et al., 2006) and Norwegian trotters (Dolvik and Klemetsdal, 2010).

In terms of embryo biotechnologies such as ICSI, ICSI-C, and cloning, work in animal models and in humans indicate that their use may affect fat deposition, glucose metabolism, and cardiovascular function in offspring (Hart and Norman, 2013). Moreover, there is ample evidence in animal species that the nutritional status of the embryo donor and recipient can also affect postnatal health (Sinclair and Watkins, 2014). Since these technologies are still new in horses, data evaluating their impact on performance are currently lacking.

Perspectives

In humans, DOHaD have been demonstrated as one of the causes for the current obesity epidemics. In horses, overweight and obesity are becoming a health issue with a prevalence ranging from 2% in animals in training to 70% depending on the use and breed of the animals. The equine metabolic syndrome that compares with the human condition is also a recent concern among veterinarians (Frank et al., 2010). More work is needed to explore the biological bases of the DOHaD in horses. Tools for the study of epigenetic modifications need to be developed, taking advantage of rapid methodological progress in other species. Finally, the data presented here plead for a better definition of broodmare nutritional requirements and for improved management of pregnant horses to prevent equine diseases and improve welfare. In view of the raising concern of westernized society for animal welfare and of the increased use of the horse as a companion animal, better preventive strategies for diseases prevention and for improving welfare are needed and may be offered through the improvement of pre- and postnatal developmental conditions.

Acknowledgements

The authors thank the Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE), the Fonds Eperon and INRA for the funding of their research on horses (FOETALIM project).

Literature Cited

Allen, W.R., S. Wilsher, C. Tiplady, and R.M. Butterfield. 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. Reprod. Suppl. 127:67–77. doi:10.1530/rep.1.00024

Bergero, D., M. Ventorp, I. Vervuert, N. Miraglia, C. Trillaud-Geyl, and E. Valle. 2006. Overview practices in the field in Europe: Rationing and prevention of nutritional related problems in the mares. In: N. Miraglia and W. Martin-Rosset, editors, Nutrition and feeding of the broodmare. Wageningen Academic Publishers, The Nertherlands. p. 263–277.

Chavatte-Palmer, P., M. Robles, A. Tarrade, and V. Duranthon. 2016. Gametes, embryos, and their epigenome: Considerations for equine embryo technologies. J. Equine Vet. Sci. 41:13–21. doi:10.1016/j.jevs.2016.03.019

Confavreux, C.B., R.L. Levine, and G. Karsenty. 2009. A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. Mol. Cell. Endocrinol. 310:21–29. doi:10.1016/j.mce.2009.04.004

Dawson, M., and J. Hone. 2012. Demography and dynamics of three wild horse populations in the australian alps. Austral Ecol. 37:97–109. doi:10.1111/j.1442-9993.2011.02247.x

Dolvik, N.I., and G. Klemetsdal. 2010. Conformational traits of Norwegian cold-blooded trotters: heritability and the relationship with performance. Acta Agr. Scand. A-An. 49:156–162. doi:10.1080/090647099424060

Frank, N., R.J. Geor, S.R. Bailey, A.E. Durham, and P.J. Johnson. 2010. Equine metabolic syndrome. J. Vet. Intern. Med. 24:467-475. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x

Galli, C., R. Duchi, S. Colleoni, I. Lagutina, and G. Lazzari. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. Theriogenology 81:138–151. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.008

Hart, R., and R.J. Norman. 2013. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I–General health outcomes. Hum. Reprod. Update 19:232–243. doi:10.1093/humupd/dms062

Hinrichs, K., Y.H. Choi, C.C. Love, and S. Spacek. 2014. Use of in vitro maturation of oocytes, intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture to the blastocyst stage in a commercial equine assisted reproduction program. J. Equine Vet. Sci. 34:176. doi:10.1016/j.jevs.2013.10.129

Jammes, H., C. Junien, and P. Chavatte-Palmer. 2011. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. Reprod. Fertil. Dev. 23:64–74. doi:10.1071/RD10259

Johnson, A.K., S.C. Clark-Price, Y.H. Choi, D.L. Hartman, and K. Hinrichs. 2010. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004–2008). J. Am. Vet. Med. Assoc. 236:983–990. doi:10.2460/javma.236.9.983

Jouven, M., F. Launay, A. Geiger, C. Guillaume, and M. Jouven. 2013. Place des parcours dans les élevages équins du Sud de la France; cas des élevages endurance. In: 39ème journée de la Recherche Equine., Paris, France. p. 85–94.

Kearns, C.F., K.H. McKeever, and T. Abe. 2002. Overview of horse body composition and muscle architecture: Implications for performance. Vet. J. 164:224–234. doi:10.1053/tvjl.2001.0702

Kuntz, R., C. Kubalek, T. Ruf, F. Tataruch, and W. Arnold. 2006. Seasonal adjustment of energy budget in a large wild mammal, the Przewalski horse (*Equus ferus przewalskii*) I. Energy intake. J. Exp. Biol. 209:4557–4565. doi:10.1242/jeb.02535

Martin-Rosset, W. 2012. Nutrition et alimentation des chevaux : Nouvelles recommandations alimentaires de l'Inra. Quae Publishers, Paris.

McKinnon, A.O., and E.L. Squires. 2009. Embryo transfer and related technologies. In: 11th Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners, Gold Coast, Australia. p. 27–57.

National Research Council. 2007. Nutrient requirements of horses. 6th ed. The National Academies Press, Washington, DC. doi: 10.17226/11653

Olstad, K., B. Ytrehu, S. Ekman, C.S. Carlson, and N.I. Dolvik. 2007. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. J. Orthop. Res. 25:1094–1105. doi:10.1002/jor.20375

Pagan, J.D., A. Koch, S. Caddel, and D.M. Nash. 2005. Size of Thoroughbred yearlings presented for auction at Keeneland sales affects selling price. In: 19th Equine Science Society Symposium, Tucson, AZ. p. 224–225. (Abstr.)

Perry, G. 2016. 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Embryo Technology Newsletter. December, 10-25.

Peugnet, P., M. Robles, L. Mendoza, L. Wimel, C. Dubois, M. Dahirel, D. Guillaume, S. Camous, V. Berthelot, M.P. Toquet, E. Richard, C. Sandersen, S. Chaffaux, J.P. Lejeune, A. Tarrade, D. Serteyn, and P. Chavatte-Palmer. 2015. Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre-weaning horses. PLoS One 10:e0122596. doi:10.1371/journal.pone.0122596

Peugnet, P., M. Robles, L. Wimel, A. Tarrade, and P. Chavatte-Palmer. 2016. Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. Theriogenology 86:99–109. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.028

Peugnet, P., L. Wimel, G. Duchamp, C. Sandersen, S. Camous, D. Guillaume, M. Dahirel, C. Dubois, L. Jouneau, F. Reigner, V. Berthelot, S. Chaffaux, A. Tarrade, D. Serteyn, and P. Chavatte-Palmer. 2014. Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. PLoS One 9:e102044. doi:10.1371/journal.pone.0102044

Robles, M., C.A. Gautier, L. Mendoza, P. Peugnet, C. Dubois, M. Dahirel, J.-P. Lejeune, I. Caudron, I. Guenon, S. Camous, A. Tarrade, L. Wimel, D. Serteyn, H. Bouraïma-Lelong, and P. Chavatte-Palmer. 2017. Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years. PLoS One 12:e0169295. doi:10.1371/journal.pone.0169295

Sinclair, K.D., and A.J. Watkins. 2014. Parental diet, pregnancy outcomes and offspring health: Metabolic determinants in developing oocytes and embryos. Reprod. Fertil. Dev. 26:99–114. doi:10.1071/RD13290

Smith, A.M., W.B. Staniar, and R.K. Splan. 2006. Associations between yearling body measurements and career racing performance in Thoroughbred racehorses. J. Equine Vet. Sci. 26:212–214. doi:10.1016/j.jevs.2006.03.002

Steegers-Theunissen, R.P., J. Twigt, V. Pestinger, and K.D. Sinclair. 2013. The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: The importance of one-carbon metabolism. Hum. Reprod. Update 19:640–655. doi:10.1093/humupd/dmt041

Tischner, M. 2000. Maternal influence on pre- and postnatal growth of foals born after embryo transfer. J. Reprod. Fertil. Suppl. 56:705–708.

Vander Heyden, L., J.P. Lejeune, I. Caudron, J. Detilleux, C. Sandersen, P. Chavatte, J. Paris, B. Deliege, and D. Serteyn. 2013. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. Vet. Rec. 172:68. doi:10.1136/vr.101034

About the Authors

Pascale Chavatte-Palmer graduated as a DVM in France. She specialized in equine reproduction and neonatology through her internship, residency, Ph.D., and post-doctoral fellowships in the UK, United States, and France. In 1998, she became lecturer at AgroParisTech school and studied fetal and postnatal development of cloned cattle at the National Institute of Agronomical Research (INRA). Since 2006, she has led a research team: "Placenta, Environment and Programming of Phenotypes," with both agricultural and biomedical objectives. Her aim is to evaluate and improve the effects of alterations of the maternal environment on feto-placental and postnatal development, using large animal species, including horses, as models. Pascale Chavatte-Palmer has been a member of the Board of the International Society for Embryo Transfer from 2009 to 2014. She was elected a member of the French Academy of Veterinarians in 2016.
Correspondence: pascale.chavatte@jouy.inra.fr

Pauline Peugnet is an agronomist specializing in livestock physiology. She completed a research master's degree from Agrocampus Ouest and the Université de Rennes I in France. Her research as a master's and then Ph.D. student at the National Institute of Agronomical Research (INRA) in Dr. Chavatte-Palmer's team focused on the postnatal impact of developmental events in both the equine and porcine species. With regard to horses, she placed particular emphasis on embryo transfer use and its effects in growing animals (energy metabolism and osteoarticular status). In 2015, she was granted a Marie Curie Innovative Training Network scholarship and joined Professor Wolf's team at MWM Biomodels in Germany as a postdoctoral scientist until 2016.

Morgane Robles is pursuing a Ph.D. at the National Institute of Agronomical Research (INRA) under the supervision of Pascale Chavatte-Palmer and Anne Couturier-Tarrade. She completed a B.Sc. in animal physiology at the University of Rennes I and graduated from the Agrocampus school in animal sciences. Since her master's thesis, her research focuses on the effects of maternal nutrition, body condition, and metabolism during gestation on growth, metabolism, and osteoarticular health of the foals until 2 yr of age.

Verwilghen, D.R., S. Janssens, V. Busoni, F. Pille, C. Johnston, and D. Serteyn. 2013. Do developmental orthopaedic disorders influence future jumping performances in Warmblood stallions? Equine Vet. J. 45:578–581. 10.1111/evj.12027

Walton, A., and J. Hammond. 1938. The maternal effects on growth and conformation in shire horse-shetland pony crosses. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 125:311–335. doi:10.1098/rspb.1938.0029

Winkelsett, S., I. Vervuert, M. Granel, A. Borchers, and M. Coenen. 2006. Feeding practice in warmboold mares and foals and the incidence to osteochondrosis. Pferdeheilkunde 21:124–126.

Revue 3 : Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring

Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Laurence Wimel, Anne Tarrade, Pascale Chavatte-Palmer

Theriogenology, 2016, 86;1:99-109
DOI : 10.1016/j.theriogenology.2016.01.028

Theriogenology 86 (2016) 99–109

Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Review article

Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring

Pauline Peugnet [a,*], Morgane Robles [a], Laurence Wimel [b], Anne Tarrade [a], Pascale Chavatte-Palmer [a]

[a] UMR 1198 Developmental Biology and Reproduction, French Institute for Agricultural Research (INRA), Jouy-en-Josas, France
[b] Experimental farm, French Horse and Riding Institute (IFCE), Chamberet, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 November 2015
Received in revised form 22 January 2016
Accepted 29 January 2016

Keywords:
Equids
Developmental origins of health and disease
Embryo transfer
Nutrition
Placenta

ABSTRACT

The study of early developmental conditioning of health and disease in adulthood is particularly relevant in the horse, which is bred mainly to perform in demanding sport challenges. On the basis of this concept, the management of the broodmare could be considered an effective means to produce animals with the desired features. Knowledge on the Developmental Origins of Health and Disease in the equine species remains relatively scarce, with some experimental studies and one single epidemiologic study. Data highlight the determinant role of the maternal environment for postnatal body conformation, immune response, energy homeostasis, osteoarticular status and thyroidal, adrenocortical, and cardiovascular functions of the foal. Most research, however, focuses on the first months/years after birth. Long-term effects on the adult horse phenotype have not been investigated so far.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

According to epidemiologic studies by Barker et al. [1–4], individuals born small for gestational age and/or with a poor growth rate in infancy (reflecting suboptimal fetal development) are at increased risk of developing noncommunicable diseases, which accounted for 68% of worldwide deaths in 2012 [5]. This observation gave rise to the Developmental Origins of Health and Disease concept or early developmental conditioning of later health and disease concept [6]. Multiple epidemiologic studies in humans [7] and experimental works in animals [8] evidenced that environmental cues delivered by both parents throughout preconception and development (including both intrauterine and suckling periods) induce physiological adaptations in the offspring which persist postnatally. If the postnatal environment differs from that of early life, the resulting mismatch might lead to deleterious long-lasting outcomes in the offspring. It is now recognized that both individuals born small and individuals born large are more susceptible to noncommunicable diseases, with a U-shaped curve of risk [9,10]. In domesticated livestock species, this process affects production traits related to commercial benefits, such as survival, growth rate, milk yield, meat quality, and fleece quantity, as shown in dairy and beef cattle, pigs, and sheep [11].

Horses are selected for characters such as temperament, strength, speed, endurance, and efficiency to convert feedstuff to energy. Although genetic selection tools have been developed to assist breeders in the choice of sires and dams [12], there is also a growing body of research reporting that the maternal environment modulates the genetic potential of the postnatal foal. This is of crucial interest in this unique species which has dual purpose as an athlete and companion animal and is often subject to overfeeding resulting in obesity [13]. Appropriate management of broodmares may be used to optimize long-term welfare, health, and sport skills of foals and adult horses, thus impacting their economic value. In this review,

* Corresponding author. Tel.: +33 1 34 65 25 58; fax: +33 1 34 65 23 64.
E-mail address: peugnetpauline@gmail.com (P. Peugnet).

0093-691X/$ – see front matter © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.028

currently available data on early developmental conditioning in the equine species are reported.

2. Maternal uterine capacity and postnatal offspring phenotype

All maternal effects described in this section are presented in Tables 1 and 2.

2.1. Proof of concept

Despite their common genetic inheritance, mules (male donkey × female horse) are larger than hinnies (male horse × female donkey). Eighty years ago, this observation led Walton and Hammond to hypothesize that the dam size determines the offspring size in the equine species. They produced reciprocal cross-bred pregnancies of Shire horses and Shetland ponies by artificial insemination. Cross-bred foals born to Shetland dams had a similar size to pure-bred Shetland foals at birth, whereas those born to Shire dams were larger, yet not as much as pure-bred Shire foals. The difference was further amplified, supposedly by the lower milk yield of Shetland dams compared with Shire dams, and differences were still observed at age 3 years [25]. This was the very first demonstration of the modulation of the foal genetic potential for fetal and postnatal growth by maternal size.

This concept was not investigated further in the equine species for another 50 years until Tischner et al. [14] produced pairs of full-sibling sex-matched Konik pony embryos. They transferred one embryo of each pair into a Draft dam, whereas the other one was carried by its biological pony dam [14]. All body measurements were greater in transferred foals at birth, including body weight (+48%) and wither height (+14%). Under similar feeding and management conditions, transferred foals developed faster (+37% weight gain) until weaning (aged 6–7 months), but the body weight difference gradually disappeared by age 2 years. Nevertheless, mature transferred foals (aged 9–13 years) remained taller (+2–5%) with longer limbs [15,16] (Table 1). Further work in Quarter Horses confirmed that the size of the recipient mare prevails over her parity in determining the foal's postnatal size [26].

2.2. Broadening of the concept to various physiological functions

2.2.1. Growth

This chapter is mainly based on experimental research by Allen et al. and Peugnet et al. which has supported the concept of early developmental conditioning of foal growth and body size by the maternal uterine capacity. Using embryo transfer between breeds of different size (ponies, P; Thoroughbred and Saddlebred horses, Tb and S; Comtois and Breton Draft horses, D; Fig. 1), they consistently managed to enhance fetal growth (+60% body weight and +15% wither height in ponies delivered by Thoroughbred or Draft surrogates; Pony-in-Thoroughbred P-Tb and Pony-in-Draft P-D, respectively; Table 1) or reduce it (−40% body weight and −12% wither height in Thoroughbred or Saddlebred horses delivered by pony surrogates; Thoroughbred-in-Pony Tb-P and Saddlebred-in-Pony S-P, respectively; Table 2) [17,21]. Fetal overgrowth of ponies resulted in overall harmoniously oversized animals until age 2 years (Table 1). Conversely, intrauterine growth retarded (IUGR) Thoroughbred and Saddlebred foals required assistance to stand and suckle in the first hours after parturition and, although born after a longer pregnancy period (+13 days), some S-P foals exhibited signs of dysmaturity [21]. All Tb-P and S-P foals underwent postnatal catch-up growth but not all body measurements caught up uniformly, thus leading to disproportionate growth. Among other observations, both IUGR groups had normal body weight at the end of the follow-up period, but shorter front legs and thinner front cannon bones (Table 2) [18,22].

Table 1
Consequences of increasing fetal growth by embryo transfer in a larger breed on the offspring postnatal phenotype in the equine species.

Recipient breed	Embryo breed	Function	Offspring age	Offspring phenotype	Reference
Draft horse	Konik pony	Growth	Birth	↗ all body measurements	[14–16]
			Birth to 6–7 mo	↗ pre-weaning growth	
			9–13 y	↗ wither height	
				↗ limbs length	
Thoroughbred	Pony	Growth	Birth	↗ most body measurements	[17–20]
			2 y	↗ body weight	
				↗ cannon bone circumference	
				↗ limbs length	
		Cardiovascular function	6 days	↗ basal arterial blood pressure	
				↘ baroreflex sensitivity	
		Adrenocortical function	6 days	↘ catecholamines secretion after hypotension challenge	
				↗ cortisol secretion in response to ACTH	
		Energy homeostasis	2 days	↗ insulin secretion after glucose bolus	
Draft horse	Welsh pony	Growth	Birth	↗ all body measurements	[21–23]
			Birth to 1½ y	harmonious overgrowth	
		Energy homeostasis	3 days	↗ insulin secretion after glucose bolus	
				↘ basal triiodothyronine	
			1 mo to 1½ y	↘ basal glycemia	
			3 mo	↘ basal triiodothyronine	
			6 mo	↘ basal triiodothyronine	
			6 mo to 1½ y	↗ basal nonesterified fatty acids	

Abbreviation: ACTH, adrenocorticotropic hormone.

Table 2
Consequences of restricting fetal growth by embryo transfer in a smaller breed on the offspring postnatal phenotype in the equine species.

Recipient breed	Embryo breed	Function	Offspring age	Offspring phenotype	Reference
Pony	Thoroughbred	Growth	Birth	↘ most body measurements (intrauterine growth retardation)	[17–20,24]
			Birth to 2 y	disharmonious catch-up growth	
			2 y	↘ most body measurements	
		Cardiovascular function	6 days	↗ baroreflex sensitivity	
		Adrenocortical function	Birth to 48 h	↗ basal cortisolemia	
			6 days	↗ catecholamines secretion after hypotension challenge	
		Energy homeostasis	2 days	↘ insulin secretion after glucose bolus	
Welsh pony	Saddlebred	Growth	Birth	↘ all body measurements (intrauterine growth retardation) dysmaturity	[21–23]
			Birth to 1½ y	disproportionate catch-up growth	
			1½ y	↘ most body measurements	
		Energy homeostasis	3 days	↘ insulin secretion after glucose bolus	
				↗ basal triiodothyronine	
			1 mo to 1½ y	↗ basal glycemia	
			6 mo	↗ insulin sensitivity	
				↘ basal nonesterified fatty acids	
				↗ basal triiodothyronine	
		Enchondral ossification	6 mo	↗ risk of osteochondrosis lesions	

2.2.2. Cardiovascular and adrenocortical functions

Concerns have been raised about further impact of the mare's size on the foal's postnatal physiological health, starting with its cardiovascular and pituitary-adrenal functions. Indeed, the basal arterial blood pressure was increased in overgrown P-Tb foals compared with control ponies at age 6 days [19]. When challenged with a nitroprusside-induced acute hypotension, they had a lower baroreflex sensitivity, lower noradrenaline and adrenaline secretion, as well as a greater cortisol response to adrenocorticotropic hormone (ACTH) [19] (Table 1). In contrast, the basal plasma cortisol concentration was increased in growth retarded Tb-P foals compared with control Thoroughbred foals during the first 48 hours after birth [24]. Acute hypotension at age 6 days, however, did not affect plasma ACTH and cortisol concentrations [19]. Moreover, Tb-P foals had a higher baroreflex sensitivity and higher catecholamines secretion [19] (Table 2).

Neonatal abnormalities in blood pressure homeostasis and glucocorticoids response to stress, as observed in premature foals, might contribute to the adult risk of developing hypertension [27,28]. This has not been described in any equine model of early developmental conditioning so far, but Fowden et al. brought some elements of answer by overexposing ponies to cortisol throughout the first 5 days after birth. At ages 1 and 2 years, insulin-induced hypoglycemia elicited a greater ACTH response in neonatally treated foals [29,30].

2.2.3. Energy homeostasis

Long-term alterations of the glucose homeostasis regulation in the foal born after between-breed embryo

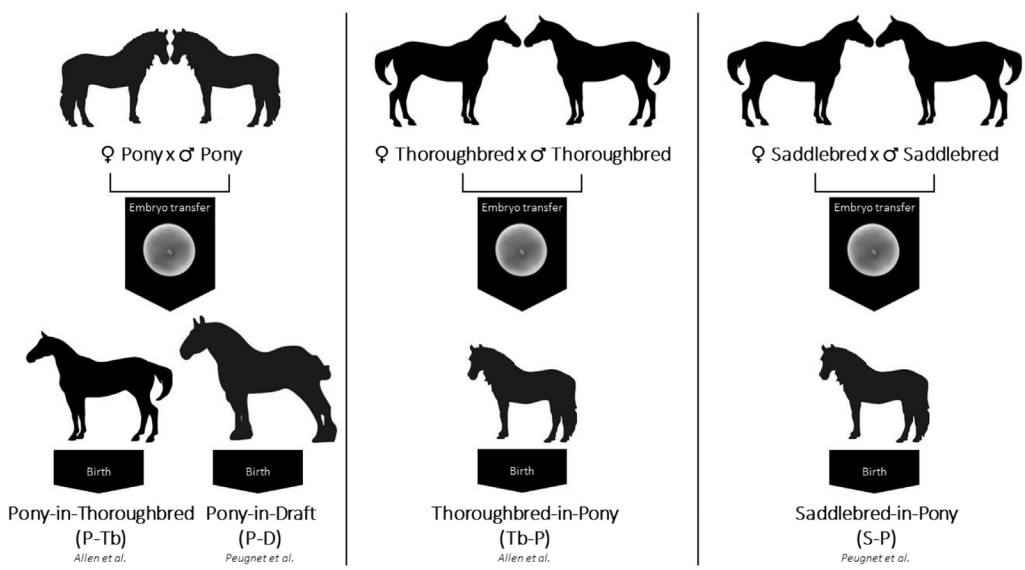


Fig. 1. Establishment of control and experimental pregnancies by artificial insemination and embryo transfer, respectively.

transfer have been reported by both Allen et al. and Peugnet et al. Interestingly, early postnatal observations are very similar between both studies. Pancreas β-cells responsiveness to exogenous glucose injection was greater in both overgrown groups of foals (P-Tb and P-D; Table 1) compared with control pony foals at ages 2 to 3 days, whereas it was very slightly decreased in both growth-retarded groups of foals (Tb-P and S-P; Table 2) compared with control Thoroughbred and Saddlebred foals, respectively [20,21]. The concomitant variations in plasma insulin concentration may partly explain the deviations above or below the normal fetal growth trajectories because insulin is a key growth factor in the fetus [31]. Changes in older foals were investigated only in the study by Peugnet et al. P-D foals were shown to have reduced basal glycemia consistently from 1 month to 1½ years of age, with normal insulin sensitivity during hyperinsulinemic euglycemic clamps immediately after weaning at age 6 months and again 1-year later [21,22] (Table 1). This suggests that insulin secretion is enhanced in overgrown foals throughout the suckling period and thereafter. On the other hand, S-P foals were shown to have elevated basal glycemia consistently from 1 month to 1½ years of age, with increased and normal insulin sensitivity immediately after weaning and at age 1½ years, respectively [21,22] (Table 2). This transition from increased to normal insulin sensitivity may be due to progressive silencing of the *pancreatic and duodenal homeobox 1* gene by epigenetic marks, which gradually impacts pancreatic development and cell differentiation, as elegantly reported in rodents [32]. To which extent epigenetic modifications control the early developmental conditioning process of the foal is still unresolved.

It is not only the carbohydrate metabolism that is affected by early life events, but rather the whole energy metabolism. As an example, the basal plasma nonesterified fatty acid concentrations, which positively correlate with lipolysis, were persistently elevated in P-D foals compared with control ponies after weaning and occasionally lowered in S-P foals compared with control Saddlebreds at weaning [22]. Moreover, the basal plasma triiodothyronine (T_3) concentration was lower in P-D foals and higher in S-P foals before weaning, which is a reflection of a reduced and augmented overall metabolic rate, respectively [21].

2.2.4. Enchondral ossification

A restricted intrauterine environment also affects the foal's postnatal osteoarticular status. Perturbation of the enchondral ossification process led the entire S-P group to be osteochondrosis-positive right after weaning. Catch-up growth, however, was accompanied by the disappearance of most lesions by age 1½ years [23] (Table 2).

2.3. Consideration of the complexity of models using various equine breeds

It has been largely evidenced over the last century that essential physiological functions of the foal can be conditioned by the maternal environment. All experimental models presented previously used either crossbreeding or embryo transfer between breeds of different uterine capacity. Equine breeds, however, also vary by their productive, metabolic, and endocrine traits, even if of close body size as shown when comparing Standardbred and Andalusian horses [33,34].

In particular, milk yield increases with breed size [35] and is linearly correlated with the foal's average daily weight gain [36]. Moreover, milk from mares of higher body condition, as often observed in pony mares [21], contains more fat and less proteins [37]. Thus, milk yield and composition are likely to amplify or mask maternal effects due to pregnancy alone. Cross-fostering is feasible in the equine species [38–40] and would enable discrimination between antenatal (intrauterine period) and postnatal (suckling period) maternal effects. Nevertheless, because pregnancy duration is highly variable between mares and there would be a need for a large number of animals, such a protocol has never been undertaken.

Glucose homeostasis has been repeatedly described to differ between adult ponies and horses [33,41,42]. These differences have been suggested to be linked to a sparing energy metabolism in ponies driven by adaptations to a harsher environment [43]. Therefore, it is plausible that healthy, pony mares used across the embryo transfer studies described previously were glucose intolerant and insulin resistant before, during, and after pregnancy, leading to even more complex models.

Finally, equine placentation occurs over the entire surface of the uterus. This is why the dam's size determines the nutritional supply to the fetus. As a result, increased or reduced uterine capacity represents both a mechanical and nutritional constraint for the developing fetus, raising the mare's nutrition as a hot topic when it comes to examining early developmental conditioning of the foal.

3. Maternal nutrition and postnatal offspring phenotype

All maternal effects described in this section are presented in Table 3.

3.1. Keeping the pregnant mare in good condition

One main challenge in breeding programs is to ensure that mares are maintaining optimal body condition throughout pregnancy and lactation, reflecting appropriate energy balance. Variations of maternal body condition score (BCS) and body weight in pregnancy seem to have limited impact on foals after birth, as seen in Quarter Horse dams allowed to lose weight throughout the last trimester of pregnancy (−4.5 kg/wk) and either maintained at low BCS or allowed to gain weight for 90 days postpartum. Their foals had normal weight at birth. Subsequent growth patterns were also normal in the first trimester after birth, just like in foals born to dams gaining weight throughout the last trimester of pregnancy (+4.5 kg/wk) and either maintained at high BCS or allowed to lose weight for 90 days postpartum [54]. This shows that as soon as the energy balance is negative, the mare mobilizes stored nutrients to ensure adequate growth and development of the fetus as a priority, through the placental supply (cf. section 4). On the other hand, Quarter Horse dams fed grain from the second month of pregnancy to achieve obesity (BCS = 9, scale 1–9)

Table 3
Consequences of maternal dietary disturbances during pregnancy on the offspring postnatal phenotype in the equine species.

Antenatal disturbance	Offspring breed	Offspring age	Offspring phenotype	Reference
Decrease in food intake in the fourth month of pregnancy	Thoroughbred	Birth	↘ body weight	[44]
Increase in weight gain from the first month of pregnancy	Thoroughbred	1 day	↘ insulin secretion after glucose bolus	[45]
Increase in starch dietary content from the seventh month of pregnancy	Thoroughbred	5 days	↗ basal glycemia ↗ basal insulinemia	[46]
		1 mo	↗ basal glycemia ↗ basal insulinemia ↘ glucose clearance after glucose bolus	
		5 mo	↘ insulin sensitivity	
Increase in dietary energy content from the eighth month of pregnancy	Standardbred	2 wk	↘ basal insulinemia ↘ basal glucose clearance ↘ insulin sensitivity	[47]
		4 and 10 mo	↘ basal insulinemia	
Grain mix supply from the seventh month of pregnancy	Quarter Horse	Birth to 18 h	↘ basal leptinemia	[48]
Concentrate feed supply (undefined timing)	Belgian Warmblood	1–3 y	↗ risk of osteochondrosis lesions	[49]
Cracked barley supply from the seventh month of pregnancy	Saddlebred	6 mo	↗ risk of osteochondrosis lesions	[50]
Oral selenium supplementation from the seventh month of pregnancy	Quarter Horse	Birth to 18 h Birth to 2 mo	↘ basal leptinemia ↗ plasma and muscle selenium content	[48,51]
Oral vitamin E supplementation from the 10th mo of pregnancy	Danish Warmblood	1 and 2 days 3 days	↗ plasma vitamin E ↗ plasma vitamin E ↗ plasma immunoglobulin M	[52]
Oral copper supplementation from the sixth month of pregnancy	Thoroughbred	5 mo	↘ risk of physitis lesions	[53]

also delivered foals of normal weight [55]. In severe cases, however, detrimental impacts of the mare's body condition variations in pregnancy can be observed in the foal. Sudden weight loss (−10%) related to an outbreak of *Streptococcus equi* causing an acute reduction of food intake in mid-pregnancy primiparous Thoroughbred dams did reduce the weight of their foals at birth (−5%). Moreover, the degree of weight loss in dams correlated negatively with the crown-rump length, the ponderal index, and the basal plasma insulin-like growth factor 1 concentration in neonates. The correlation with the ponderal index was still observed at weaning [44] (Table 3).

In general, moderate weight loss in the pregnant mare does not appear to alter the foal birth weight, although it might affect the mare colostrum quality and subsequent milk yield, thus reducing the foal passive immunity and growth rate [56]. An epidemiologic study conducted among Kentucky Thoroughbred dams and their foals highlighted that weight-gaining lactating mares produced faster-growing foals, with a positive correlation between foals BCS and mares daily weight change at the time of peak lactation (aged 2–3 months) [57]. In other words, thinner mares have reduced milk production and their foals have lower growth rate. This can be corrected though, as shown in thin Draft dams which were given access to sufficient feed to gain weight after parturition and whose milk production caught up with that of heavier dams within 1 month [58].

3.2. Overfeeding the pregnant mare

How much weight the mare should put on in pregnancy is a crucial question, especially as overfeeding commonly occurs in the equine industry. The broodmare is often fed a high-energy diet containing lots of soluble carbohydrates such as starch, in an attempt to ensure a healthy foal at birth. Transfer of small pony embryos into large Thoroughbred or Draft recipients (P-Tb), however, was previously used to increase the nutrient supply to fetuses and evidence a range of disturbances in neonates (cf. section 2.2, [14–24]). Based on these observations, primiparous Thoroughbred dams were fed concentrates and hay from the first month of pregnancy either to become obese (8< BCS <9, scale 1–9) or achieve a moderate body condition (4< BCS <5, scale 1–9). Unfortunately, they were all infected by *S equi* in the second trimester of pregnancy, superimposing a major but similar weight loss to both nutritional planes throughout 43 days (cf. section 3.1, [44,45]). Weight gain in pregnancy was still greater in the high group compared with the moderate group, as was basal insulinemia. As a result, foals from the high group had reduced pancreas responsiveness to exogenous glucose injection at age 1 day [45] (Table 3). Further research then focused on excessive maternal nutrition in the final months of pregnancy, when most equine fetus growth happens. Thoroughbred dams were fed a high- or low-starch (mainly corn starch) diet from the seventh month of pregnancy and were all switched to the low starch diet 5 days after parturition. Foals from the high-starch group had greater basal glycemia and insulinemia at ages 5 days and 1 month, lower basal glucose clearance rate at age 1 month, and lower insulin sensitivity at age 5 months [46] (Table 3). One last study used a high- or low-energy diet in Standardbred mares throughout the last trimester of pregnancy. Foals from the high-energy group had lower basal insulinemia, basal glucose clearance, and insulin sensitivity at age 2 weeks and persistent lower basal insulinemia at ages 4 and 10 months [47] (Table 3). None of the mentioned

nutritional planes altered the foal birth weight. A range of dynamic metabolic disturbances, however, was evidenced in the foal throughout the first postnatal months.

It is possible to modulate the foal's postnatal physiological functions through excessive maternal energy intake in pregnancy. Further research focused on the nature of the source of energy as a potential aggravating factor of previously observed disturbances has been undertaken. Because it is a frequent practice in the equine industry, supplementation of the late-pregnant mare with concentrate feed was brought into focus. Quarter Horse dams were either kept on pasture (100% digestible energy recommendations of the National Research Council [NRC]) or fed additional grain mix (120% digestible energy recommendations of NRC) throughout the last 5 months of pregnancy. Both nutritional planes were combined with a selenium supplement, the specific effects of which are reported further in the following (cf. section 3.3, [48,51,59]). Both groups of late-pregnant dams gained weight, but pasture-only dams lost body condition and rump fat, showing greater mobilization of body fat stores in the absence of concentrate feed in the ration. As a result, grain-fed dams were overall heavier (+10%) and fatter without achieving obesity (+34% BCS and +31% rump fat) throughout the feeding treatment period, with elevated leptinemia (+116%) throughout the last 3 weeks of pregnancy. Their colostrum was poorer in immunoglobulin (Ig) G and sugar [59]. Although they had similar body measurements and plasma IgG concentration, neonates from grain-fed dams exhibited reduced leptinemia throughout the first 18 hours after birth [48] (Table 3). Leptin from energy stores acts as a signal of satiety, thus these foals might demonstrate increased appetite and be more susceptible to metabolic disorders such as obesity later in life. These are just assumptions, but there is already worrying evidence that feeding pregnant mare concentrate feed is a determining factor in the development of metabolic dysfunction–related diseases in the older foal. An epidemiologic study conducted among 1-to-3-year-old Belgian Warmblood foals showed that dams fed concentrates (in addition to forages or not) during pregnancy were more likely to produce foals with osteochondrosis lesions than dams fed forages only. The proportion of osteochondrosis-positive foals ranged 36% in the concentrate group to 4% in the forage-only group [49] (Table 3). Moreover, a tendency for increased osteochondrosis relative risk was observed in experimental 6-month-old Saddlebred foals whose dams were fed cracked barley in addition to hay and silage from the seventh month of pregnancy [50] (Table 3). Nevertheless, osteochondrosis is a dynamic disease and most lesions are apparent by age 1 year. These foals are currently being further examined.

3.3. Supplementing the pregnant mare

3.3.1. Selenium

Among other detrimental effects, overfeeding entails oxidative stress. Damage to biomolecules by resulting reactive oxygen species may be problematic in late pregnancy, when metabolic demand is maximal. Oral supplementation with selenium, a powerful antioxidant mineral, was shown to not only increase plasma selenium concentration but also plasma IgG concentration and primary response to an antigenic challenge in 1-to-3-year-old Shetland ponies [60]. Hence, there was an interest to test if supplementation of the late-pregnant mare with selenium would counteract the decreased colostrum IgG concentration observed in case of excessive digestible energy intake (cf. section 3.2, [48,51,59]). Quarter Horse dams kept on pasture or fed additional grain mix in the second half of pregnancy were supplemented orally with selenomethionine (SeMet) yeast until parturition. Although maternal SeMet supplementation significantly increased colostrum selenium content, as well as plasma and muscle selenium concentrations in dams and their foals until age 2 months, it failed to increase the IgG content of colostrum and foal's plasma, irrespective of the nutritional plane [51,59]. Surprisingly, however, maternal SeMet supplementation lowered the plasma leptin concentration of the foals over the first 18 hours after birth [48] (Table 3).

3.3.2. Vitamin E

Vitamin E (α-tocopherol), another important antioxidant, has proved to be more successful in promoting the passive transfer of Ig from mare to foal. Indeed, oral supplementation of Danish Warmblood dams with RRR-α-tocopherol (the natural form of vitamin E) throughout the last 5 weeks of pregnancy until 2 days after parturition increased the vitamin E concentration of the plasma, colostrum, and milk of the dams (1, 2, and 3 days after parturition), as well as the milk IgG and IgM contents (2 and 3 days after parturition). As a result, foals born to RRR–α-tocopherol-supplemented dams had higher plasma vitamin E (aged 1, 2, and 3 days) and IgM (aged 3 days) concentrations [52] (Table 3). This confirms previous report of maternal vitamin E supplementation being an effective booster of the neonatal foal's immune function [61].

3.3.3. Copper

Copper also drew lots of attention because of its potential role in the pathogenesis of developmental orthopedic diseases. The equine fetus establishes its hepatic stores of trace elements in the last months of pregnancy for mobilization during the first months after birth. Thus, copper supplementation of the late-pregnant mare was hypothesized to have protective effects on foal articular cartilage. Pasture-grazing Thoroughbred dams were supplemented orally with copper throughout the last semester of pregnancy and their foals were also supplemented orally with copper until age 5 months. Maternal copper supplementation reduced both the radiographic physitis score (−38%) and the necropsy articular lesions number in foals at age 5 months, whereas no improvement of either parameter was observed when only the foals were copper supplemented [53] (Table 3). This suggests that oral copper supplementation of the mare in late pregnancy is more efficient in ensuring healthy skeleton development than supplementation of the foal after birth. Moreover, although they had unchanged osteochondritic status, Warmblood foals with high hepatic copper storage at birth developed fewer and less severe osteochondritic lesions from 5 to 11 months of age [62], indicating a role of copper in the

process of early lesions repair. Pasture-grazing Thoroughbred dams, however, were supplemented with parenteral injections of copper calcium edetate monthly throughout the last 4 months of pregnancy without any observable changes in foals at age 5 months, in respect to the hepatic copper content at birth, as well as the number and severity of osteochondritic lesions at age 5 months [63,64]. Whether the role of copper in the development and repair of articular cartilage defects in the early postnatal period was overemphasized, remains to be elucidated.

3.3.4. Arginine

Arginine may also be an interesting supplement in the pregnant mare. This semi-essential amino acid (only neonates need exogenous supply) is a precursor of nitric oxide and polyamines, which stimulate cellular proliferation, migration and remodeling, angiogenesis, and blood vessels dilatation [65]. By upregulating blood flow, both nitric oxide and polyamines may increase the nutrient delivery from maternal to fetal circulations. Arginine is also necessary to the biosynthesis of creatinine, which was shown to be an antioxidant that reduces inflammatory reactions and enhances glucose tolerance in other species [66]. Despite its critical roles, very little is known about arginine requirements of the equine species and the latest NRC recommendations barely mention it [67]. Oral supplementation of nonpregnant Thoroughbred and Quarter Horse dams with L-arginine (1% of total dietary intake) impaired the absorption of numerous amino acids [68], which might be due to a substrate competition at the amino acids transporters level. This seems not to have any detrimental effects in pregnant mares supplemented with 0.5% L-arginine throughout the last 3 months of pregnancy until 2 weeks after parturition or in their foals which were normal weight and size at birth. Dams supplemented with 1% L-arginine even had increased uterine arterial blood flow before and after parturition, as shown using Doppler ultrasonography [69] and those supplemented with 0.5% L-arginine had faster uterine fluid clearance after parturition, as observed by transrectal ultrasound [70]. On the other hand, arginine is also a potent trigger of pancreatic insulin secretion, especially in the fetus [71]. Arginine supplementation might be a way to moderate negative maternal effects on the foal's metabolism (cf. section 3.2, [45–50]).

4. An active conditioning agent of the postnatal foal: the placenta

The placenta plays a pivotal role in transmitting stimuli from the maternal environment to the equine fetus. Its capacity to maintain fetal homeostasis depends on its size, morphology, blood flow, nutrients transporters abundance, intrinsic nutrients consumption, and production, as well as on the dam's hormonal, oxidative, nitrosative, and inflammatory status [72]. In the equine species, microcotyledons with intense branching ensure maximal contact surface between the endometrium and the noninvasive, diffuse, epitheliochorial allantochorion, hence maximizing hemotrophic exchange [73]. Between-breed embryo transfer experiments were the first to point out placental function as the primary control mechanism for the equine fetus growth alterations (cf. section 2.1, [17,21]). P-Tb and P-D pregnancies were accompanied by an impressive increase in placental weight (+59% and +80%, respectively), gross area (+22% and +160%, respectively), and microscopic area of feto-maternal contact (+83% in P-Tb), leading to fetal overgrowth [17], although no changes were observed in the expression of candidate genes in P-D placentae when compared with control pony placentae [22]. In contrast, fetal growth retardation in Tb-P and S-P pregnancies was linked to placental restriction, with reduced placental weight (−39% and −19%, respectively), gross area (−30% and −48%, respectively), and microscopic area of feto-maternal contact (−30% in Tb-P) [17]. Interestingly, although placental gross area was similar, the ratio between the microscopic area of feto-maternal contact and the placental gross area was increased (+55%) in Tb-P placentae compared with control pony placentae. This highlights the interplay between the maternal and fetal genomes. It appears that the pony recipient imposes a constant placental size whatever the breed of the fetus she is carrying, but the fetus of the largest breed manages to increase the relative microscopic area of feto-maternal contact. This increase may be driven by lengthening or intense branching of microcotyledons villi [17]. In addition, expression of the genes encoding both insulin-like growth factor 2 and sodium-coupled neutral amino-acid transporter 2 was reduced in S-P placentae compared with control Saddlebred placentae [22]. This might be an adaptive mechanism aiming to limit growth of the large-breed fetus carried by a small-breed recipient, so as to guarantee a successful parturition for both the mare and the foal.

The role of the placenta in the developmental conditioning of the foal was further evidenced in models using various nutritional planes of the pregnant mare. Thoroughbred foals born to dams fed an obesogenic diet throughout pregnancy had a similar birth weight as those born to dams fed a moderate one (cf. section 3.2, [45]), even though placentae from the obese group were larger (+11%). As mentioned previously, maternal weight loss in mid-pregnancy following a *S equi* outbreak (cf. section 3.1, [45]) resulted in a slightly reduced foal birth weight. In this natural experiment, maternal weight loss correlated negatively with placental weight, gross area, microscopic area of feto-maternal contact but correlated positively with placental efficiency (defined as the ratio of foal birth weight to placental gross area). This means that as the weight loss increases, the placenta is even smaller but becomes even more efficient. Even if placentae and foals from the infected group were smaller than those from the noninfected group, this suggests some functional adaptation of the allantochorion to cope with the adverse maternal environment in an attempt to ensure proper development of the foal. This adaptive capacity of the allantochorion is supported by observations in Saddlebred dams fed only hay and silage in late pregnancy. They underwent moderate undernutrition as evidenced by body condition loss and a transient increase in plasma nonesterified fatty acids concentrations compared with dams fed additional cracked barley [50]. Placentae from undernourished dams were of same weight and gross area as those from well-fed dams, but an increase

in the volume of microcotyledonary vessels was observed, which might have led to increased feto-maternal exchanges [74]. In another study, cellular size (inferred from the protein to DNA ratio in allantochorion samples) was reduced in placentae from SeMet-supplemented Quarter Horse dams kept on pasture or fed additional grain mix in the second half of pregnancy, without any alterations of the placental weight or foal birth weight compared with non-supplemented dams [59]. This is consistent with the observed increased cellular efficiency in the allantochorion.

In summary, the equine placenta is conditioned by maternal factors while inducing morphologic and physiological adaption to meet fetal demand. Much more work is needed to decipher the physiological significance of previously reported structural remodeling and functional adaptations and their mechanisms.

5. Conditioning the health of the worldwide population?

5.1. Conditioning a healthy equine neonate

The primary effect of detrimental developmental conditioning in the equine species might be impaired neonatal health. Various stressors of the pregnant mare were shown to affect the foal's size, cardiovascular and pituitary-adrenal function, carbohydrate and lipid metabolism, as well as immune status in the first hours/days after birth. There is additional clinical evidence that adverse fetal development, as reflected by IUGR, strongly affects the neonate. Rossdale et al. [75] associated IUGR in the equine species with pulmonary failure (atelectasis, respiratory distress, and respiratory arrhythmia) in the very first days after birth and with increased predisposition to exercise-induced pulmonary hemorrhage, chronic obstructive pulmonary disease, neuropathies (laryngeal hemiplegia), osteochondrosis, and other myopathies in the older horse. These changes are likely to alter an individual's sport capacities. IUGR foals have been reported in twin pregnancies [76], but other potential causes are poorly documented.

5.2. Conditioning a healthy athletic adult horse

With the exception of Tischner et al. [16] who re-examined their ponies born to Draft dams at ages 9 to 13 years (cf. section 2.1), there is currently no evidence of developmental conditioning of the adult horse by the maternal environment. Indeed, experimental horses are expensive to house and feed, which deters very long-term follow-up studies. This question is of primary interest though, especially in this unique species destined to compete in demanding sport challenges. Numerous reasons can put an early end to athletic careers, starting with musculoskeletal lesions, which have been reported to account for 56% to 79% of lost training days and for approximately 25% of the equine industry economic losses [77]. Worrying epidemiologic and experimental evidence of the maternal environment influencing the development of osteochondrosis lesions in foals were reported previously (cf. section 2.2.4, [23,49]). The influence of the maternal environment on foal muscle quality has not yet been explored. In other species, however, maternal obesity and overfeeding during pregnancy have been shown to impact fetal myogenesis [78], the mature offspring muscle fiber type and proportion of body muscle to adipose tissue [79,80]. On the other hand, overfeeding of the mare is known to affect glucose and insulin dynamics of the foal, sometimes causing the development of insulin resistance (cf. section 3.2, [45–47]). If persistent, the latter may lead to metabolic disorders in the adult horse, such as laminitis and obesity [81,82]. Both diseases are likely to alter reproductive performance [83,84] and sport capacities [85,86]. This is how the early developmental environment contributes to the high prevalence of obesity in the equine population, which has been estimated to be up to 45% in Scotland [87] and 54% in the UK [88].

5.3. The horse as a useful model for biomedical research

The horse is very occasionally used for biomedical research. In the field of early developmental conditioning, however, it might offer unique opportunities. First, pregnancy duration of the horse (11 months) is closer to that of the human (9 months) than that of the mouse is (3 weeks). As in other large animals, noninvasive monitoring by ultrasonography, frequent blood and tissue sampling, and multiple catheterization are possible without sacrifice, unlike in rodents. This enables serial sampling throughout life, as well as catheterization of both the maternal and fetal vasculatures during pregnancy and under various experimental conditions [89,90]. This technique is of particular interest in the study of nutrient transfers across the placenta [91,92]. Monitoring of long-term effects of early life events is made possible by the horse life span (up to 30 years), but this feature has been underused. Additionally, both the equine and human species have unique similarities in terms of naturally occurring metabolic, musculoskeletal, and airway diseases. In particular, the obesity epidemic in the equine population parallels that in the human population. They have a remarkably similar modern behavioral etiology, as equine breeders feed their animals refined nutritionally dense rations and people consume energy-dense refined foods [13]. Moreover, the notion of metabolic syndrome has been introduced in both species. This collection of clinical signs and clinicopathologic changes is amazingly similar between the horse and the human because it commonly entails insulin resistance, obesity, hypertriglyceridemia, and hypertension among other criteria [93,94]. The link between early life events and development of metabolic syndrome has been illustrated many times over in other species [95]. The horse's athleticism makes it perfect for sport medicine research as well [96], in particular for investigating the early origins of bone and muscle defects (cf. section 5.2, [23,49]). As a summary, using the horse enables dual-purpose research, which benefits the horse clinically and economically and improves human health and wellness by better understanding of the mechanisms of early developmental conditioning.

6. Conclusion

There is increasing interest in the early developmental conditioning of the offspring for modulating domestic animals phenotype [97], but investigation of this concept in the equine species is still in the early stages. The maternal environment interplays with the fetal genotype heredity. As developed previously, it is now proven to contribute actively to the establishment of the foal's postnatal body conformation, immune response, energy metabolism, osteoarticular status and thyroidal, and adrenocortical and cardiovascular functions. Adequate management of broodmares is thus an important determinant in the production of future horses with the desired features. It is too soon to address definite practical recommendations to equine breeders.

When calling on assisted reproduction techniques and especially embryo transfer, some factors must be taken into consideration. Selection of recipients of close conformation to donors is not novel. A mismatch between both mares size causes IUGR or, conversely, fetal overgrowth. Both strongly impact the metabolism of the offspring and would potentially be detrimental in later life. The latter is critical when it comes to studbooks that register only animals of defined wither height. Selection of recipients of close metabolic and endocrinological functions to donors, however, has never been proposed. The lack of descriptive research regarding physiological specificities of horse breeds does not favor such considerations when planning breeding activities. Moreover, assisted reproduction techniques have been linked to epigenetic reprogramming abnormalities and postnatal phenotypic alterations in humans, cattle, sheep, and mice [98–100]. This remains little investigated in horses [101].

On the other hand, most breeders pay much more attention to feeding growing horses properly rather than broodmares. Yet, an increased focus on the broodmare's nutrition could boost the production of healthy and athletic horses. Excess feeding of pregnant dams, in particular, can be detrimental to the offspring's fitness. Whether it is the dam's body condition or the concentrate feed intake (and the resulting postprandial glycemia and insulinemia peaks) that drive the alterations observed in foals is unclear. Most studies, however, agree on the necessity for a better definition of the optimal broodmare diet composition in terms of energy but also trace elements.

More research is needed in the field of early developmental conditioning of the equine offspring. Studies focus indeed on the very first months/years after birth. Follow-up of foals until an age when they become performers remains to be undertaken, in particular as conditioning effects are often revealed after a long latency and in the presence of a revealing factor [102] and are susceptible to being passed on to next generations [2,103]. Furthermore, it is uncertain if fillies and colts respond differently to a same environmental exposure and which epigenetic marks may be vectors in determining this conditioning phenomenon [104,105]. Therefore, establishment of more equine models of early developmental conditioning implementing various stressors must be encouraged.

Acknowledgments

The authors are thankful for the funding of the FOETALIM project by the French Horse and Riding Institute (IFCE), the Eperon fund, and the incentive action of the French Institute for Agricultural Research (INRA) department Animal Physiology and Breeding Systems. The authors are members of COST Action FA0702 GEMINI "Maternal interaction with gametes and embryo," FA1201 EPICONCEPT "Epigenetics and periconception environment," and BM1308 SALAAM "Sharing advances on large animal models."

References

[1] Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet 1986;1:1077–81.
[2] Barker DJ. The fetal origins of diseases of old age. Eur J Clin Nutr 1992;46(Suppl 3):S3–9.
[3] Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. Mol Med Today 1995;1:418–23.
[4] Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. Br Med J 1991;303:1019–22.
[5] Global status report on non-communicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization; 2015.
[6] Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev 2014;94:1027–76.
[7] Barker D. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med 2007;261:412–7.
[8] McMullen S, Mostyn A. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. Proc Nutr Soc 2009;68:306–20.
[9] Gluckman PD, Hanson MA. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. Semin Fetal Neonatal Med 2004;9:419–25.
[10] Stettler N, Zemel BS, Kumanyika S, Stallings VA. Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. Pediatrics 2002;109:194–9.
[11] Chavatte-Palmer P, Richard C, Peugnet P, Robles M, Rousseau-Ralliard D, Tarrade A. The developmental origins of health and disease: importance for animal production. Anim Reprod 2015;12:505–20.
[12] Arnason T, van Vleck L. Genetic improvement of the horse. In: Bowling A, Ruvinsky A, editors. The genetics of the horse. First edition. MA,USA: CABI; 2000. p. 473–97.
[13] Johnson PJ, Wiedmeyer CE, Messer NT, Ganjam VK. Medical implications of obesity in horses—lessons for human obesity. J Diabetes Sci Technol 2009;3:163–74.
[14] Tischner M. Embryo recovery from Polish-pony mares and preliminary observations on foal size after transfer of embryos to large mares. Equine Vet J 1985;3:96–8.
[15] Tischner M. Development of Polish-pony foals born after embryo transfer to large mares. J Reprod Fertil Suppl 1989;35:705–9.
[16] Tischner M. Maternal influence on pre- and postnatal growth of foals born after embryo transfer. J Reprod Fertil Suppl 2000:705–8.
[17] Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale PD, et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. Reproduction 2002;123:445–53.
[18] Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. Reproduction 2004;127:67–77.
[19] Giussani DA, Forhead AJ, Gardner DS, Fletcher AJ, Allen WR, Fowden AL. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. J Physiol 2003;547:67–76.
[20] Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. J Endocrinol 2004;181:459–67.
[21] Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal

growth and metabolism in pre-weaning horses. PLoS One 2014;9:e102044.
[22] Peugnet P, Valentino S, Robles M, Wimel L, Reigner F, Serteyn D, et al. Developmental programming of growth, glucose homeostasis and predisposition to osteochondrosis in foals. Preconference symposium on equine reproduction. Paris, FR: 41st International Embryo Transfer Society annual conference; 2015.
[23] Peugnet P, Mendoza L, Wimel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, et al. Longitudinal study of growth and osteoarticular status in foals born to between-breed embryo transfers. J Equine Vet Sci 2016;37:24–38.
[24] Ousey JC, Rossdale PD, Fowden AL, Palmer L, Turnbull C, Allen WR. Effects of manipulating intrauterine growth on post natal adrenocortical development and other parameters of maturity in neonatal foals. Equine Vet J 2004;36:616–21.
[25] Walton A, Hammond J. The maternal effects on growth and conformation in Shire horse-Shetland pony crosses. Proc R Soc B 1938;125:311–35.
[26] Pool-Anderson K, Raub RH, Warren JA. Maternal influences on growth and development of full-sibling foals. J Anim Sci 1994;72:1661–6.
[27] Seckl JR. Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. Steroids 1997;62:89–94.
[28] Korner PI. Baroreceptor resetting and other determinants of baroreflex properties in hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 1989;15:45–64.
[29] Jellyman JK, Valenzuela OA, Allen VL, Forhead AJ, Holdstock NB, Fowden AL. Neonatal glucocorticoid overexposure programs pituitary-adrenal function in ponies. Domest Anim Endocrinol 2015;50:45–9.
[30] Jellyman JK, Allen VL, Holdstock NB, Fowden AL. Glucocorticoid overexposure in neonatal life alters pancreatic beta-cell function in newborn foals. J Anim Sci 2013;91:104–10.
[31] Fowden AL. Endocrine regulation of fetal growth. Reprod Fertil Dev 1995;7:351–63.
[32] Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. J Clin Invest 2008;118:2316–24.
[33] Bamford NJ, Potter SJ, Harris PA, Bailey SR. Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. Domest Anim Endocrinol 2014;47:101–7.
[34] Bamford NJ, Baskerville CL, Harris PA, Bailey SR. Postprandial glucose, insulin, and glucagon-like peptide-1 responses of different equine breeds adapted to meals containing micronized maize. J Anim Sci 2015;93:3377–83.
[35] Doreau M, Boulot S. Recent knowledge on mare milk production: a review. Livestock Prod Sci 1989;22:213–35.
[36] Doreau M, Boulot S, Martin-Rosset W, Robelin J. Relationship between nutrient intake, growth and body composition of the nursing foal. Reprod Nutr Dev 1986;26:683–90.
[37] Doreau M, Boulot S, Chilliard Y. Yield and composition of milk from lactating mares: effect of body condition at foaling. J Dairy Res 1993;60:457–66.
[38] Daels PF, Duchamp G, Massoni P, Chavatte P. Induction of lactation in non-foaling mares and growth of foals raised by mares with induced lactation. Theriogenology 2002;58:859–61.
[39] Chavatte-Palmer P, Arnaud G, Duvaux-Ponter C, Brosse L, Bougel S, Daels P, et al. Quantitative and qualitative assessment of milk production after pharmaceutical induction of lactation in the mare. J Vet Intern Med 2002;16:472–7.
[40] Porter RH, Duchamp G, Nowak R, Daels PF. Induction of maternal behavior in non-parturient adoptive mares. Physiol Behav 2002;77:151–4.
[41] Jeffcott LB, Field JR, McLean JG, O'Dea K. Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and standardbred horses. Equine Vet J 1986;18:97–101.
[42] Rijnen KE, van der Kolk JH. Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. Am J Vet Res 2003;64:1260–4.
[43] Langlois B. Inter-breed variation in the horse with regard to cold adaptation—a review. Livestock Prod Sci 1994;40:1–7.
[44] Wilsher S, Allen WR. Effects of a Streptococcus equi infection-mediated nutritional insult during mid-gestation in primiparous thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. Equine Vet J 2006;38:549–57.
[45] Ousey JC, Fowden AL, Wilsher S, Allen WR. The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. Equine Vet J 2008;40:673–9.
[46] George LA, Staniar WB, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. Domest Anim Endocrinol 2009;37:23–9.
[47] Dobbs TN, Foote CE, Cawdell-Smith AJ, Anderson DL, Boston RC, Bryden WL. Glucose and insulin dynamics in mares and their foals. Australasian equine Science symposium. Gold Coast, QLD, Australia 2012. p. 56.
[48] Cavinder CA, Burns SA, Coverdale JA, Hammer CJ, H G, Hinrichs K. Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. Prof Anim Scientist 2012;28:344–50.
[49] van der Heyden L, Lejeune JP, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, et al. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. Vet Rec 2013;172:68.
[50] Peugnet P, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, et al. Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre-weaning horses. PloS one 2015;10:e0122596.
[51] Karren BJ, Thorson JF, Cavinder CA, Hammer CJ, Coverdale JA. Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: selenium concentrations and glutathione peroxidase. J Anim Sci 2010;88:991–7.
[52] Bondo T, Jensen SK. Administration of RRR-alpha-tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and enhances vitamin E and IgM status in foals. J Anim Physiol Anim Nutr 2011;95:214–22.
[53] Pearce SG, Firth EC, Grace ND, Fennessy PF. Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. Equine Vet J 1998;30:211–8.
[54] Henneke DR, Potter GD, Kreider JL. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. Theriogenology 1984;21:897–909.
[55] Kubiak J, Evans W, Potter G, Harms P, Jenkins W. Parturition in the multiparous mare fed to obesity. 10th Equine nutrition and physiology society symposium. Colorado State University, CO, USA: Equine nutrition and physiology society; 1989.
[56] Banach M, Ewans J. Effects of inadequate energy during gestation and lactation on the estrous cycle and conception rates of mares and their foals' weights. 7th Equine nutrition and physiology society symposium. Virginia State University, VA, USA: Equine nutrition and physiology society; 1981. p. 97–100.
[57] Pagan J, Brown-Douglas C, Caddel C. Body weight and condition of Kentucky thoroughbred mares and their foals as influenced by month of foaling, season and gender. In: Advances in equine nutrition IV. UK: Nottingham University press; 2009. p. 137–45.
[58] Doreau M, Boulot S, Bauchart D, Barlet JP, Martin-Rosset W. Voluntary intake, milk production and plasma metabolites in nursing mares fed two different diets. J Nutr 1992;122:992–9.
[59] Thorson JF, Karren BJ, Bauer ML, Cavinder CA, Coverdale JA, Hammer CJ. Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: foaling data. J Anim Sci 2010;88:982–90.
[60] Knight DA, Tyznik WJ. The effect of dietary selenium on humoral immunocompetence of ponies. J Anim Sci 1990;68:1311–7.
[61] Hoffman R, Morgan K, Phillips J. Dietary vitamin E supplementation in the periparturient period influences immunoglobulins in equine colostrum and passive transfer in foals. In: Society Enap, editor. 16th Equine nutrition and physiology society symposium. North Carolina State University, NC,USA 1999. p. 96.
[62] van Weeren PR, Knaap J, Firth EC. Influence of liver copper status of mare and newborn foal on the development of osteochondrotic lesions. Equine Vet J 2003;35:67–71.
[63] Gee E, Davies M, Firth E, Jeffcott L, Fennessy P, Mogg T. Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams. Vet J 2007;173:109–17.
[64] Gee EK, Firth EC, Morel PC, Fennessy PF, Grace ND, Mogg TD. Articular/epiphyseal osteochondrosis in Thoroughbred foals at 5 months of age: influences of growth of the foal and prenatal copper supplementation of the dam. N Z Vet J 2005;53:448–56.
[65] Wu G, Morris Jr SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem J 1998;336(Pt 1):1–17.
[66] Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. Amino Acids 2009;37:153–68.

[67] Nutrient requirements of horses. Sixth edition. Washington DC: National Research Council; 2007.
[68] Kelley DE, Warren LK, Mortensen CJ. Orally supplemented L-arginine impairs amino acid absorption depending on dose in horses. J Anim Sci 2014;92:5560–6.
[69] Mortensen CJ, Kelley DE, Warren LK. Supplemental L-arginine shortens gestation length and increases mare uterine blood flow before and after parturition. J Equine Vet Sci 2011;31:514–20.
[70] Mesa AM, Warren LK, Sheehan JM, Kelley DE, Mortensen CJ. L-Arginine supplementation 0.5% of diet during the last 90 days of gestation and 14 days postpartum reduced uterine fluid accumulation in the broodmare. Anim Reprod Sci 2015;159:46–51.
[71] Fowden AL. Effects of arginine and glucose on the release of insulin in the sheep fetus. J Endocrinol 1980;85:121–9.
[72] Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. J Neuroendocrinol 2008;20:439–50.
[73] Allen WR, Wilsher S. A review of implantation and early placentation in the mare. Placenta 2009;30:1005–15.
[74] Robles M, Peugnet P, Dubois C, Wimel L, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. Barley supplementation at mid-gestation in broodmares does not affect fetal development and is accompanied by minimal placental adaptations. 41st International embryo transfer society annual conference. Paris, FR: Reproduction, Fertility and Development; 2014. p. 147–148.
[75] Rossdale PD, Ousey JC. Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. Equine Vet Educ 2002;14:98–112.
[76] Ginther OJ, Douglas RH. The outcome of twin pregnancies in mares. Theriogenology 1982;18:237–44.
[77] Rogers CW, Bolwell CF, Gee EK. Proactive management of the equine athlete. Animals 2012;2:640–55.
[78] Tong JF, Yan X, Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. Maternal obesity downregulates myogenesis and beta-catenin signaling in fetal skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;296:E917–24.
[79] Bee G. Effect of early gestation feeding, birth weight, and gender of progeny on muscle fiber characteristics of pigs at slaughter. J Anim Sci 2004;82:826–36.
[80] Long NM, George LA, Uthlaut AB, Smith DT, Nijland MJ, Nathanielsz PW, et al. Maternal obesity and increased nutrient intake before and during gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in adult offspring. J Anim Sci 2010;88:3546–53.
[81] Vick MM, Adams AA, Murphy BA, Sessions DR, Horohov DW, Cook RF, et al. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. J Anim Sci 2007;85:1144–55.
[82] Treiber KH, Kronfeld DS, Geor RJ. Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. J Nutr 2006;136:2094S–8S.
[83] Nagy P, Huszenicza G, Juhasz J, Kulcsar M, Solti L, Reiczigel J, et al. Factors influencing ovarian activity and sexual behavior of postpartum mares under farm conditions. Theriogenology 1998;50:1109–19.
[84] Fitzgerald BP, Reedy SE, Sessions DR, Vick MM, Murphy BA. Obesity disrupts the duration of the estrous cycle in the mare. J Dairy Sci 2003;86:102.
[85] Kearns CF, McKeever KH, Kumagai K, Abe T. Fat-free mass is related to one-mile race performance in elite standardbred horses. Vet J 2002;163:260–6.
[86] Garlinghouse SE, Burrill MJ. Relationship of body condition score to completion rate during 160 km endurance races. Equine Vet J Suppl 1999:591–5.
[87] Wyse CA, McNie KA, Tannahill VJ, Murray JK, Love S. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. Vet Rec 2008;162:590–1.
[88] Stephenson HM, Green MJ, Freeman SL. Prevalence of obesity in a population of horses in the UK. Vet Rec 2011;168:131.
[89] Taylor PM, Silver M, Fowden AL. Intravenous catheterisation of foetus and mare in late pregnancy: management and respiratory, circulatory and metabolic effects. Equine Vet J 1992;24:391–6.
[90] Comline R, Hall L, Lavelle R, Silver M. The use of intravascular catheters for long-term studies on the mare and fetus. J Reprod Fertil Suppl 1975;23:583–8.
[91] Stammers JP, Hull D, Silver M, Fowden AL. Fetal and maternal plasma lipids in chronically catheterized mares in late gestation: effects of different nutritional states. Reprod Fertil Dev 1995;7:1275–84.
[92] Marshall DE, Gower DB, Silver M, Fowden A, Houghton E. Cannulation in situ of equine umbilicus. Identification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of differences in steroid content between arterial and venous supplies to and from the placental surface. J Steroid Biochem Mol Biol 1999;68:219–28.
[93] Frank N, Geor RJ, Bailey SR, Durham AE, Johnson PJAmerican College of Veterinary Internal Medicine. Equine metabolic syndrome. J Vet Intern Med 2010;24:467–75.
[94] International Diabetes Federation worldwide definition of the metabolic syndrome. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2014.
[95] Brenseke B, Prater MR, Bahamonde J, Gutierrez JC. Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. J Pregnancy 2013;2013:368461.
[96] Denoix JM. The horse as an athlete: an animal model of choice for sports medicine (sonographic studies of joint disorders). Bull de l'académie nationale de médecine 2008;192:521–36.
[97] Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Kiefer H, Duranthon V, Jammes H. Breeding animals for quality products: not only genetics. Reprod Fertil Dev 2016;28.
[98] Thompson JG, Kind KL, Roberts CT, Robertson SA, Robinson JS. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? Hum Reprod 2002;17:2783–6.
[99] McEvoy TG, Robinson JJ, Sinclair KD. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. Reproduction 2001;122:507–18.
[100] Donjacour A, Liu X, Lin W, Simbulan R, Rinaudo PF. In vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. Biol Reprod 2014;90:80.
[101] Franciosi F, Lodde V, Goudet G, Duchamp G, Deleuze S, Douet C, et al. Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. Mol Hum Reprod 2012;18:243–52.
[102] Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. Prog Biophys Mol Biol 2011;106:272–80.
[103] Aiken CE, Ozanne SE. Transgenerational developmental programming. Hum Reprod Update 2014;20:63–75.
[104] Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. J Exp Biol 2015;218:50–8.
[105] Gabory A, Roseboom TJ, Moore T, Moore LG, Junien C. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. Biol Sex Differ 2013;4:5.

Revue 4 : Gametes, embryos, and their epigenome : considerations for equine embryo technologies

Pascale Chavatte-Palmer, **Morgane Robles**, Anne Tarrade, Véronique Duranthon

Journal of Equine Veterinary Science, 2016, 41:13-21
DOI: 10.1016/j.jevs.2016.03.019

Journal of Equine Veterinary Science 41 (2016) 13–21

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.j-evs.com

Review Article

Gametes, Embryos, and Their Epigenome: Considerations for Equine Embryo Technologies

Pascale Chavatte-Palmer*, Morgane Robles, Anne Tarrade, Véronique Duranthon

UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy-en-Josas, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 February 2016
Received in revised form 30 March 2016
Accepted 30 March 2016
Available online 6 April 2016

Keywords:
Horse
Reproduction
DOHaD
Periconception
Epigenetic

ABSTRACT

The preconceptional and/or periconceptional periods (before and just after fertilization until the embryo blastocyst stage) are critical for the developmental origins of health and disease. Major epigenetic modifications occur during gametogenesis, fertilization, and the early stages of embryonic development. These modifications can be altered by the environment *in vivo*, particularly through maternal and/or paternal nutrition, but also *in vitro*, including during procedures such as assisted reproduction. Female gametes, but also male, are involved as targets of the epigenetic modifications and also as vectors of modified epigenetic marks, leading to long-term effects on the offspring. Physiological and epigenetic effects observed vary depending on fetal gender. Although this review focuses on new developments in epigenomics in the horse, most of the mechanism information was derived from mice, men, and cattle. Indeed, although the long-term impact of equine embryo technologies is yet to be evaluated, data from other species already indicate that the nutritional status of both gamete donors and of the recipient mare should not be overlooked. Finally, as opposed to most other domestic species, and closer to the situation in humans, older horses are used for reproduction, and this may also affect the quality of gametes and subsequently offspring to be born.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. The Periconceptional Period: A Critical Period of Development

1.1. Gametogenesis and Preimplantation Development

The kinetics of development of male and female gametes differ enormously, with differences between mammalian species. In females, the differentiation of oogonia is completed during the fetal period. Thereafter, oogonia remain quiescent for a very long period, until the onset of follicular growth at puberty. Conversely, the differentiation of the male gamete is continuous, beginning at puberty through a mechanism of self-renewal of spermatogonia. Before this, both genders share a common period, that of the establishment of the gonads due to colonization of the genital ridges by primordial germ cells and the creation of the pool of gonia that will ultimately lead to the future gametes. The constitution of this stock, the timing of which in the horse is described in Fig. 1, is critical because it will influence the future fertility of an individual, as this depends on the initial size of this pool of gonia (unknown).

In females, in most species, including the horse [1], oogonia undergo a significant wave of apoptosis (affecting more than 75% of oogonia) during fetal development, resulting in a pool of approximately 35,000 primordial follicles in the equine ovary, with much variation between individuals [2]. A second critical step takes place during the oocyte maturation phase of the cycle, after puberty (which takes place in the first or second spring after birth, depending on season of birth and breed [3,4]). This step is

* Corresponding author at: Pascale Chavatte-Palmer, UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Domaine de Vilvert Bât 231, F-78350, Jouy en Josas, France.
E-mail address: pascale.chavatte@jouy.inra.fr (P. Chavatte-Palmer).

0737-0806/$ – see front matter © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.019

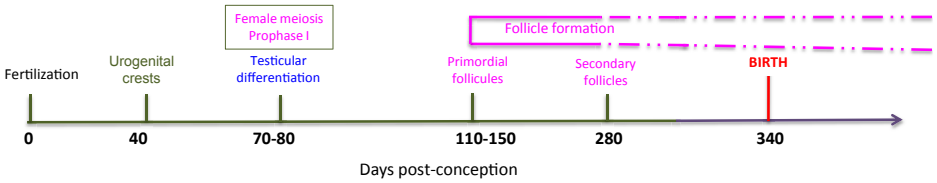


Fig. 1. Timing of gonadal development in the horse [113].

critical because it is at the origin of many aneuploid oocytes, which are the first cause of abnormalities of embryonic development (affecting up to 50% of the embryos in humans) and result, in most cases, in early embryonic loss. This phenomenon has been linked to the inhibition of histone deacetylation during female gamete meiosis [5] and has been clinically related to the aging of the oocyte, contributing to the causes for increased embryo loss after embryo transfer (ET) when embryos are collected in older mares [6–8]. Interestingly, in vitro maturation of oocytes in the horse has been shown to affect H4 acetylation [9].

With regard to the male gamete, spermatogonia do not develop further until puberty (first spring after birth). A continuous renewal of the spermatogonia will subsequently allow the constant production of a large number of gametes throughout life. The vulnerability of the male gamete is tied to aging itself, and the accumulation of point mutations over time is at the origin of the de novo appearance of genetic pathologies of dominant transmission in humans [10].

Gametogenesis is also a period of epigenetic changes, in particular, modifications of DNA methylation marks (see [11,12] for reviews on epigenetic mechanisms per se). During this period, there are successively global demethylation, then a de novo methylation before fertilization (Fig. 2A) [13,14]. Parental imprinting, where a gene is expressed depending on its parental (maternal or paternal) origin is a special mechanism that concerns around 100 genes in mice (unknown in horses). The process of parental imprinting begins with the apposition of paternal imprint to the sperm and maternal imprint to the oocyte [15]. In females, the erasure of previous parental imprinting occurs during oogenesis in fetal life, whereas the reset occurs during follicular development in adulthood. In males, the two steps take place during the embryo-fetal period. Imprinting is not unknown in horses. In fact, the hybrid growth vigor of the mule is probably a textbook example of unbalanced imprinted gene expression of horse and donkey promoting growth of the resulting mule.

Fertilization brings together in the oocyte cytoplasm, the genomes of the two gametes and triggers the end of oocyte meiosis II. The embryo then starts the first cell cycle during which the two parental genomes evolve separately within two pronuclei. Each of the two parental genomes are at first transcriptionally inactive, and the maternal transcripts and proteins stored during oogenesis in the oocyte cytoplasm support the early stages of development, at least to the point where the embryonic genome is activated (estimated to be around the six cells stage in horses [16,17]).

1.2. Epigenetic Modifications Associated to the Reprogramming of the Genome of the Zygote [18].

The reprogramming of the zygote genome is based on intense epigenetic modifications (Fig. 2B) [14,19]. These changes begin with replacement of protamines in the paternal genome by histones and continue throughout the first cellular cycles. Parental genomes and the embryonic genome gradually lose the repressive epigenetic marks (histone and DNA methylation) and acquire permissive marks allowing transcription, such as histone acetylation [20]. During preimplantation development, post-translational modifications of histones are particularly dynamic, with some persisting to the blastocyst stage, whereas others are more transient [21]. Nevertheless, the chromatin state of the two parental genomes is different, and epigenetic changes that affect them are asymmetrical. For example, when the protamines of the sperm genome are replaced by histones, the allocation of some histone variants of maternal origin is asymmetrical, as demonstrated in mice, where the H3.3 variant is biased in favor of the paternal genome [22], whereas TH2B (testis-specific H2B) previously present in the maternal genome is rapidly incorporated into the paternal pronucleus [23,24]. Also in mice, studies show that as soon as protamines are replaced, histones associated with paternal genome are hyperacetylated, whereas the methylation on histones that are associated with the maternal genome persists [21].

DNA methylation is also very active during this period. Parental asymmetry is also observed during fertilization: in mice and humans, the genome of the sperm is more methylated than that of the oocyte [25–27]. Moreover, the distribution of the DNA methylation is not strictly identical in the two types of gametes: indeed, non-CpG cytosine methylation is present in oocytes but is absent in sperm (CpG are regions of DNA where a cytosine nucleotide is followed by a guanine nucleotide in the linear sequence of bases along its 5' → 3' direction. DNA methylation most commonly occurs on the cytosine in CpG regions) [25,26]. These gamete genomes are globally demethylated during the period between fertilization and the first stages of cleavage, but kinetics vary according to species [27], and all regions of the genome are not affected in the same way by this demethylation [26–29]. Nevertheless, the embryonic genome remains globally hypomethylated until the blastocyst stage.

At the blastocyst stage, a differential methylation between the inner cell mass and trophectoderm is reported in some studies in humans [25] and mice, as well as in several models of domestic mammals, where the

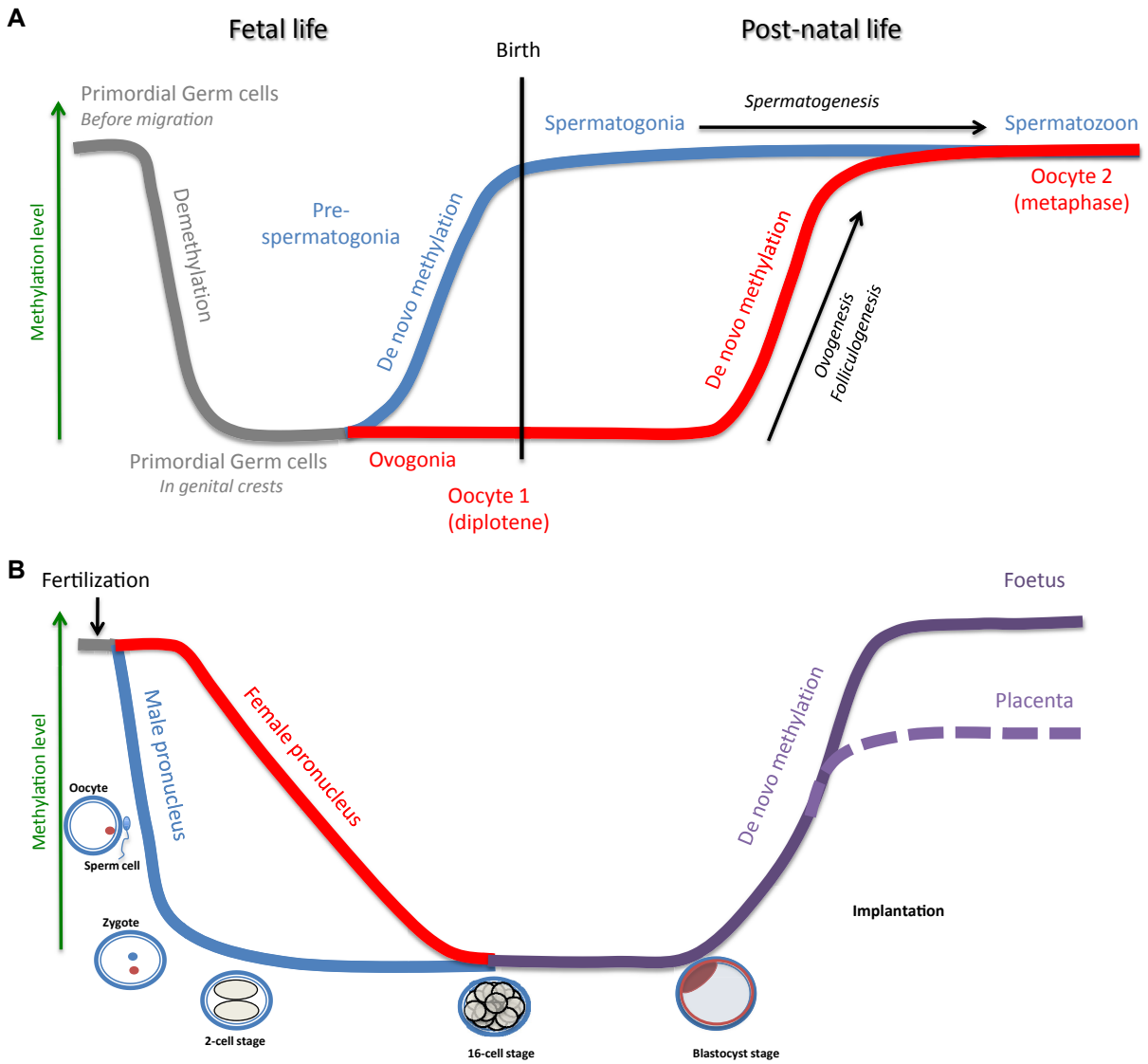


Fig. 2. Schematic methylation patterns in germ cells and embryos (based on [13]). (A) Schematic representation of the methylation pattern of germ cells. (B) Schematic representation of the methylation pattern of the embryo.

difference between lineages moves gradually during the blastocyst stage. Despite these significant modifications of the epigenome during the preimplantation period, some structural components of chromatin and some epigenetic marks are transmitted by the gametes to the embryo. For example, in man, histone characteristics of the constitutive spermatic heterochromatin inherited by the zygote contribute to the formation of paternal embryonic genome heterochromatin [30]. Similarly, specific methylation of sperm or oocyte CpG is maintained in the inner cell mass and in the postimplantation embryo in mice and humans [26,27]. The link between these epigenetic changes and transcriptional activation of the embryonic genome is not fully understood, but artificial increase in histone acetylation through the inhibition of demethylation disrupts the activation of the embryonic genome, showing that the dynamic epigenetic changes are involved in this activation.

These dynamics are altered by changes in the embryonic environment. In particular, the progressive DNA demethylation of the embryonic genome is different depending on whether the embryo develops in vivo or in vitro and on the culture medium used in vitro [31]. Differences in gene expression between equine in vitro– or in vivo–produced embryos are likely to be due to these differences in the apposition of epigenetic marks [32–34]. Currently, it is not known whether any of these early differences in DNA methylation are likely to be corrected in the post-implantation remethylation phase. Studies in mice show that not all are corrected, however, because differences in methylation among adult individuals generated from embryos developed in vivo or in vitro have been demonstrated

in this species [35,36]. Furthermore, methylation differences have been demonstrated between children born from assisted reproductive technologies (ART) compared to those born from natural conception [36,37]. These initial epigenetic disturbances, stored by the embryonic genome, could explain the long-term effects of the environment of the preimplantation embryo (see the following section). They can also explain differences in gene expression affecting early development of the embryo and the allocation of cells to the first two lineages (trophectoderm and inner cell mass). In terms of disturbance of early gene expression, the period of the major activation of the embryonic genome is the most sensitive to changes in the embryonic environment [38].

2. Long-Term Effects of the Periconceptional Environment: What is the Evidence?

2.1. Epidemiologic Evidence in Humans

In humans, "metabolic programming" or "fetal programming" has been particularly well studied in cases of maternal undernutrition during pregnancy, during the Dutch famine of the winter of 1944 to 1945 [39]. The observed effects are strongly correlated with the period of exposure of individuals. Thus, individuals born to mothers exposed to famine during early pregnancy were not smaller at birth but were more likely to become obese in adulthood. These individuals also had a risk of developing cardiovascular disease three times higher than those whose mothers had not suffered famine and had a lipid profile predisposing them to atherosclerosis. In contrast, individuals born to mothers exposed to famine in mid or late pregnancy were smaller at birth and had an increased risk of developing glucose intolerance and insulin resistance [40]. Moreover, the methylation of the insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) gene was reduced in 60-year-old individuals exposed in utero to this famine compared with nonexposed individuals [41].

Recent epidemiologic studies have shown that variations of maternal weight between the age of 20 and that of motherhood affect fetal development; thus, the risk of intrauterine growth restriction is increased in children born to women who were slightly overweight at age 20 but who lose weight subsequently before motherhood [42]. Folic acid supplementation, as recommended to prevent the risk of developing neural tube defects during the periconceptional period, induces the hypermethylation of the *IGF2* gene in children, which can be associated with fetal growth retardation [43].

2.2. Experimental Evidence in Animals Other than Horses

Many experimental approaches emphasize the importance of maternal environment, for example, obesity, undernutrition, vitamin B deficiency, inflammatory processes, during the periconceptional period on long-term offspring development [44–46]. For example, in mice, hyperthermia and maternal inflammation caused by an injection of lipopolysaccharide just after fertilization [47] and maternal undernutrition during the preconceptional and/or periconceptional period can disturb development and epigenetic marks in offspring, with long-term changes differing according to gender [47,48]. In rabbits, a maternal diet enriched in fat is associated with changes in gene expression in the embryo and an accumulation of lipid droplets in the trophoblast of the blastocyst. This is observed in late pregnancy, in the placenta, which is of trophoblastic origin [49].

Effects of alterations in the maternal periconceptional nutrition in domestic species have been recently reviewed [50]. In vivo–produced embryos from vitamin B12 and folate-deprived ewes, subsequently transferred into control recipients became overweight as adults, displaying several components of the metabolic syndrome such as increased blood pressure and altered immune responses [51]. Altered DNA methylation was also observed in the liver of these offspring [51]. Still, in sheep, it was shown that the nutritional restriction of embryo donors resulted in adrenocortical hypertrophy in the offspring and disturbed regulation of the renin angiotensin system within the adrenal gland, but alteration of the methylation in promoters of candidate genes was not observed [52,53].

In other studies, periconceptional maternal undernutrition in ewes induced effects on insulin signaling in fetal skeletal muscle, lipogenesis, heart, adipose tissue and liver metabolism, adrenocortical function, and microRNA expression with effects differing between singleton and twin pregnancies [54–60]. Effects seem to differ according to the genetic background and the precise timing and nature of the nutritional challenge imposed on the animals.

2.3. Experimental Evidence in Horses

Long-term effects of nutritional changes in mares have only been studied through ET experiments and nutritional challenges throughout gestation (see [61] for a recent review).

Inducing fetal growth restriction or fetal growth excess through ET in a mare of a smaller or larger breed, respectively, than the embryo, results in inducing fetal growth alterations that persist until adulthood [62–65]. Restricted or increased fetal and postnatal growth [62,66] were also associated with neonatal alterations in glucose sensitivity of β pancreatic islets [67], adrenocortical development [68], blood pressure, and catecholamine response to hypotension [69]. Moreover, restricted foals appeared to be more prone to osteochondrosis than controls at 6 months of age; although with correct postweaning nutritional management, this difference was not present any more at 18 months of age [70].

Long-term programming effects of maternal nutrition have also been demonstrated as foals born to dams fed starch-rich diets in late gestation were shown to tend to be less insulin-sensitive at 5 months of age compared with foals whose dams were fed low-starch diets [71]. In the field, an epidemiologic study in Belgium highlighted the adverse effects of feeding concentrates to pregnant mares, but also foals for the first year of age, on postnatal development of osteochondrosis lesions in the offspring [72]. It was also shown experimentally that feeding mares with a moderate amount of cracked barley during the last third of

pregnancy as opposed to forage only (hay and silage) slightly affected plasma osteocalcin concentrations and glucose metabolism at 3 days of age, but not thereafter, at least until weaning [73]. Although not significant, it must be noted, however, that lesions of osteochondrosis were slightly increased [73] and that more work is needed to explore the combined effects of maternal and postnatal nutrition on the onset of osteoarticular lesions.

So far, there are no data yet available on long-term effects of variations in maternal periconceptional nutrition in this species.

2.4. The Emerging Role of Paternal Transmission

The concept of nongenetic paternal transmission of diseases has recently emerged [74]. The first observations were made in animal models. In rats, paternal obesity as a result of a high-fat diet induced in adult female offspring, an increase in body weight, adiposity, and dysfunction of pancreatic β cells with glucose intolerance and insulin resistance. In these animals, the IL13RA2 gene encoding the alpha-2 receptor for IL-13 (interleukin 13 receptor alpha-2) that modulates the growth and invasion of various pancreatic cell lines, was highly demethylated, thus affecting β-cell function in the pancreas [75]. In offspring of male mice fed a low-protein diet, the expression profile of many liver genes involved in lipid metabolism and cholesterol, such as peroxisome proliferator-activated receptor γ is altered [76]. Also in mice, paternal obesity induced by a high-fat diet was shown to reduce global DNA methylation and alter testicular transcriptional profiles and the expression of spermatic microRNAs in offspring [77,78]. Adult male and female offspring were glucose-intolerant, insulin-resistant, and obese [79]. Besides the metabolic damage, sperm mobility was reduced in association with an increase in free radicals and increased fragmentation of the spermatic DNA in male offspring, whereas in females, the number of oocytes that developed to the metaphase 2 stage in maturation medium was reduced, and impaired mitochondrial membrane potential was observed in oocytes [79]. In humans, paternal obesity is associated with hypomethylation of differentially methylated regions of imprinted genes such as IGF-2, mesoderm-specific transcript, neuronatin, and PEG-3 (paternally expressed gene-3) in cord blood leukocytes of children [74].

3. Impact of Embryo Biotechnologies on Offspring Health

3.1. Available Technologies in Horses

Depending on equine breeds, various reproductive technologies are allowed by studbooks, whereas no artificial reproduction is allowed in Thoroughbreds, most other studbooks allow artificial insemination. The first successful ET in the horse dates back to 1972 [80]. Nowadays, ET is performed in most sport breeds, but so far, the lack of very successful superovulation techniques [81] and limited embryo freezing ability in the equine species limit the extension of reproductive technologies [82], although considerable progress has been made over the years [83]. Recent statistics from the International Embryo Technology Society, report a little more than 44,000 collected and 31,000 transferred embryos, mostly fresh worldwide, but these statistics do not include several countries in 2013, with a large predominace of both production and transfer in Brazil and Argentina [84]. In 2014, 195 embryos were produced in vitro by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and 141 of these were transferred, mostly frozen, by Cesare Galli laboratory in Italy [85], but data were not available from other countries.

Although in vitro fertilization (IVF) has been successfully performed using in vivo–matured oocytes that were transferred back into the oviduct immediately after fertilization [86,87], this technique has not been reproduced successfully. To date, oocyte and embryo technologies available in the horse include in vitro oocyte maturation after oocyte retrieval by ovum pick-up or recovery from postmortem ovaries; oocyte transfer, that is, the surgical transfer of an in vivo–matured oocyte into the oviduct or the preovulatory follicle of a mare; ICSI, which is clinically applied worldwide; somatic cell nuclear transfer and cryopreservation of oocytes and embryos by vitrification [88]. Moreover, embryos can also be biopsied for preimplantation diagnosis [88].

3.2. Long-Term Effects of Assisted Reproduction Techniques in Humans and Nonequine Species

If maternal and even paternal nutrition can have such an effect on the metabolic status of offspring, it seems important to study the long-term effects of ART. The expression of embryonic genes and fetal and placental outcomes can indeed be changed by such practices through suboptimal embryo culture conditions in vitro performed after IVF and thus cause long-term effects on development, including effects on fetal and postnatal growth and on glucose homeostasis. Indeed, epigenetic effects of ART on oocytes and embryos have been described in many species [31,89], but these modified epigenetic marks have not yet been directly related to long-term outcomes. Moreover, these effects may depend on culture medium composition and on the gender of the embryo [48]. In ruminants, large offspring syndrome [90] has been associated with the presence of serum in embryonic culture medium and the coculture of embryos on a layer of cells before transfer into the recipient at the blastocyst stage. In humans (as well as in mice), embryo culture induces an increase in the incidence of intrauterine growth retardation with an incidence of 35% versus 9% for embryos from natural fertilization, according to a recent American review [91]. Some of these effects are due, however, to the significant impact of multiple pregnancies but should, however, not be overlooked. Postnatal growth is affected at least until 2 years of age [92], and the risk for these children of developing cardiovascular and metabolic diseases as well as depression could also be increased [93,94], although the increased parental age in these populations remains a confounding factor. Finally, although a link between epigenetic alterations and occurrence of cancer is established in humans, the monitoring of children born through ART is currently reassuring [93] although a study does show a moderate increase in the

risk of these children developing cancer (odds ratio 1.42 [95% confidence interval: 1.09–1.87; $P < .01$]) which also could be linked to the higher rate of premature birth and neonatal hypoxia [95]. In addition, changes in genomic methylation patterns have been observed in children conceived from ART [36,37]. These changes affect genes involved in chronic metabolic diseases [96] and could also be the cause of the decrease in trophoblast development and fetal weight through effects on imprinted genes. Several studies have also reported cases of abnormalities in the expression of imprinted genes in the offspring, leading to rare syndromes such as Beckwith–Wiedemann and Silver–Russell [97].

In terms of cryopreservation, it has been shown in rabbits that embryo vitrification modifies placental and postnatal phenotype with reduced fetal and placental weight in mid-gestation and increased fetal weight together with overexpression of many genes involved in protein synthesis, lipid metabolism, and molecular transport at term. This is also associated with increased neonatal survival and litter size in first and second generation [98,99].

In males, some methylation patterns are altered in ejaculated spermatozoa and testicular tissues in infertile patients [100]. In mice and women, ovarian hyperstimulation, which is necessary during IVF or ICSI procedures, increases the risk of oocyte aneuploidy but can also disrupt the mechanisms leading to parental imprinting [101]. In fact, an impact of ovarian stimulation is observed on the methylation and expression of imprinted genes in the embryo in about half of cases [102]. The oocyte maturation medium and the embryo culture procedure have also been identified as major factors modifying epigenetic marks in humans and animals [29,102,103], with the appearance of alterations in DNA methylation depending on culture media used [31] (see previous section).

3.3. Long-Term Effects of ART in Horses

As discussed previously, the choice of the recipient is certainly, so far, the most important factor inducing long-term effects in equine offspring. Healthy recipients of similar size and metabolism as the embryo donor are highly recommended.

ART itself, however, may also affect development. In the horse, chromosome segregation, spindle morphology and histone acetylation have been shown to be affected by *in vitro* oocyte maturation [9,104,105]. The age of the oocyte donor also impacts on the quality of the oocyte [106], which is a concern in the equine industry where older females of high genetic merit are used for reproduction (see [107] for review on oocyte maturation). The impact on the embryo and long term health of the new procedures such as *in vitro* oocyte maturation or oocyte vitrification, however, has not been thoroughly evaluated.

In any case, so far, no obvious adverse effects of ET and embryo related technologies have been reported, although for nuclear transfer, like in other species, pathological fetal and neonatal development is often observed [108,109]. The large offspring syndrome reported in ruminants does not appear to occur in the horse. This is interesting since it has been associated in ruminants with the presence of serum in culture medium [90], and equine *in vitro* embryos are routinely produced in the presence of serum without problems with the foals [110]. It has recently been shown, however, that cellular allocation, in particular the epiblast, can be modified through changes in the glucose concentrations in the embryo culture medium [111]. Possible long-term effects of embryo technologies on placental development, adult offspring metabolism, and ability to perform and reproduce are unknown. It is also possible that the recent development of some superovulation techniques in the horse [112] may lead to some epigenetic effects.

4. Conclusion

Evidence from humans, laboratory, and domestic animals indicate that the nutritional status of the dam and the sire, before and after fertilization and during the periconceptional period, as well as ART procedures, may have an impact on offspring health, in particular its energy metabolism, cardiovascular function, and adiposity. These factors are important for the horse industry, but the relatively recent development of embryo technologies in the horse and the very long time between the birth of a foal and the evaluation of its sporting and reproductive abilities often precludes the establishment of a direct effect of these factors on offspring performance. The study of effects on the placenta, which can be considered as a proxy for exploring fetomaternal exchanges during pregnancy, may be useful to further evaluate long-term effects of embryo technologies and breeding practices, although epidemiologic studies remain necessary.

Acknowledgments

P.C.-P., M.R., and A.T. received funding from “Institut français du Cheval et de l’Equitation” (IFCE) and from le Fonds Eperon for their research on the Developmental Origins of Health and Disease in horses (successive FOETALIM grants). All the authors are members of COST actions FA0702 GEMINI “Maternal Interactions with Gametes and Embryos,” FA1201 EPICONCEPT “Epigenetics and Periconception Environment,” and BM1308 SALAAM “Sharing Advances on Large Animal Models”.

References

[1] Deanesly R. Germ cell proliferations in the fetal horse ovary. Cell Tissue Res 1977;185:361–71.
[2] Driancourt MA, Paris A, Roux C, Mariana JC, Palmer E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. Reprod Nutr Dévelop 1982;22:1035–47.
[3] Brown-Douglas CG, Firth EC, Parkinson TJ, Fennessy PF. Onset of puberty in pasture-raised Thoroughbreds born in southern hemisphere spring and autumn. Equine Vet J 2004;36:499–504.
[4] Cebulj-Kadunc N, Cestnik V, Kosec M. Onset of puberty and duration of seasonal cyclicity in Lipizzan fillies. Equine Vet J 2006;38:350–3.
[5] De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. Developmental Biol 2004;275:447–58.
[6] Panzani D, Vannozzi I, Marmorini P, Rota A, Camillo F. Factors affecting recipients’ pregnancy, pregnancy loss, and foaling rates in

a commercial equine embryo transfer program. J Equine Vet Sci 2016;37:17–23.
[7] Ball BA, Little TV, Weber JA, Woods GL. Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. J Reprod Fertil 1989;85:187–94.
[8] Scoggin CF. Not just a number: effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred brood-mares. Reproduction. Fertil Development 2015;27:872–9.
[9] Franciosi F, Lodde V, Goudet G, Duchamp G, Deleuze S, Douet C, et al. Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. Mol Hum Reprod 2012;18: 243–52.
[10] Goriely A, Wilkie AO. Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. Am J Hum Genet 2012;90:175–200.
[11] Dindot SV, Cohen ND. Epigenetic regulation of gene expression: emerging applications for horses. J Equine Vet Sci 2013;33:288–94.
[12] Jammes H, Junien C, Chavatte-Palmer P. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. Reprod Fertil Dev 2011;23:64–74.
[13] MacDonald WA, Mann MR. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. Mol Reprod Dev 2014;81:126–40.
[14] Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. Trends Genet 2012;28:33–42.
[15] Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. Mammalian genomic imprinting. Cold Spring Harbor Perspect Biol 2011;3:a002592.
[16] Brinsko SP, Ball BA, Ignotz GG, Thomas PG, Currie WB, Ellington JE. Initiation of transcription and nucleologenesis in equine embryos. Mol Reprod Dev 1995;42:298–302.
[17] Grondahl C, Hyttel P. Nucleologenesis and ribonucleic acid synthesis in preimplantation equine embryos. Biol Reprod 1996;55: 769–74.
[18] Duranthon V, Watson AJ, Lonergan P. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. Reproduction 2008;135:141–50.
[19] Ross PJ, Canovas S. Mechanisms of epigenetic remodelling during preimplantation development. Reprod Fertil Development 2015; 28:25–40.
[20] Gabory A, Dandolo L. Épigénétique et développement : l'empreinte parentale. Med Sci (paris) 2005;21:390–5.
[21] Beaujean N. Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture. Mol Reprod Dev 2014;81:100–12.
[22] Inoue A, Zhang Y. Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. Nat Struct Mol Biol 2014;21:609–16.
[23] Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, et al. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. Genes Dev 2013;27: 1680–92.
[24] Rousseaux S, Petosa C, Muller CW, Khochbin S. A novel key element in post-meiotic male genome reprogramming. Med Sci (paris) 2010;26:130–2.
[25] Guo H, Zhu P, Yan L, Li R, Hu B, Lian Y, et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. Nature 2014;511:606–10.
[26] Wang L, Zhang J, Duan J, Gao X, Zhu W, Lu X, et al. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. Cell 2014;157:979–91.
[27] Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. PLoS Genet 2014;10:e1004868.
[28] Smith ZD, Chan MM, Humm KC, Karnik R, Mekhoubad S, Regev A, et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. Nature 2014;511:611–5.
[29] Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MR. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. Biol Reprod 2010;83:938–50.
[30] van de Werken C, van der Heijden GW, Eleveld C, Teeuwssen M, Albert M, Baarends WM, et al. Paternal heterochromatin formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone modifications. Nat Commun 2014;5:5868.
[31] Reis e Silva AR, Bruno C, Fleurot R, Daniel N, Archilla C, Peynot N, et al. Alteration of DNA demethylation dynamics by in vitro culture conditions in rabbit pre-implantation embryos. Epigenetics 2012; 7:440–6.
[32] Smits K, Goossens K Fau - Van Soom A, Van Soom A Fau - Govaere J, Govaere J Fau - Hoogewijs M, Hoogewijs M Fau - Peelman LJ, Peelman LJ. In vivo-derived horse blastocysts show transcriptional upregulation of developmentally important genes compared with in vitro-produced horse blastocysts.
[33] Mortensen CJ, Choi YH, Ing NH, Kraemer DC, Vogelsang MM, Hinrichs K. Heat shock protein 70 gene expression in equine blastocysts after exposure of oocytes to high temperatures in vitro or in vivo after exercise of donor mares. Theriogenology. 74:374–383.
[34] Desmarais JA, Demers SP, Suzuki J, Laflamme S, Vincent P, Laverty S, et al. Trophoblast stem cell marker gene expression in inner cell mass-derived cells from parthenogenetic equine embryos. Reproduction 2011;141:321–32.
[35] Morgan HD, Jin XL, Li A, Whitelaw E, O'Neill C. The culture of zygotes to the blastocyst stage changes the postnatal expression of an epigentically labile allele, agouti viable yellow, in mice. Biol Reprod 2008;79:618–23.
[36] Melamed N, Choufani S, Wilkins-Haug LE, Koren G, Weksberg R. Comparison of genome-wide and gene-specific DNA methylation between ART and naturally conceived pregnancies. Epigenetics 2015;10:474–83.
[37] Turan N, Katari S, Gerson LF, Chalian R, Foster MW, Gaughan JP, et al. Inter- and intra-individual variation in allele-specific DNA methylation and gene expression in children conceived using assisted reproductive technology. Plos Genet 2010;6:e1001033.
[38] Gad A, Schellander K, Hoelker M, Tesfaye D. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. Anim Reprod Sci 2012;134:76–83.
[39] Roseboom TJ, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. Early Hum Development 2006;82:485–91.
[40] Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. Reprod Toxicol 2005;20:345–52.
[41] Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proc Natl Acad Sci U S a 2008;105: 17046–9.
[42] Diouf I, Charles MA, Thiébaugeorges O, Forhan A, Kanminski N, Heude B, et al. Maternal weight change before pregnancy in relation to birthweight and risks of adverse pregnancy outcomes. Eur J Epidemiol 2011;26:789–96.
[43] Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA, et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. PLoS One 2009;4:e7845.
[44] Fleming TP, Velazquez MA, Eckert JJ, Lucas ES, Watkins AJ. Nutrition of females during the peri-conceptional period and effects on foetal programming and health of offspring. Anim Reprod Sci 2012;130:193–7.
[45] Fleming TP, Lucas ES, Watkins AJ, Eckert JJ. Adaptive responses of the embryo to maternal diet and consequences for post-implantation development. Reprod Fertil Dev 2012;24:35–44.
[46] Chavatte-Palmer P, Vialard F, Tarrade A, Dupont C, Duranthon V, Levy R. DOHaD et programmation pré- et périconceptuelle. Med Sci 2016. in press.
[47] Williams CL, Teeling JL, Perry VH, Fleming TP. Mouse maternal systemic inflammation at the zygote stage causes blunted cytokine responsiveness in lipopolysaccharide-challenged adult offspring. Bmc Biol 2011;9:49.
[48] Laguna-Barraza R, Bermejo-Alvarez P, Ramos-Ibeas P, de Frutos C, Lopez-Cardona AP, Calle A, et al. Sex-specific embryonic origin of postnatal phenotypic variability. Reprod Fertil Dev 2012;25:38–47.
[49] Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Aubriere MC, Peynot N, Dahirel M, Bertrand-Michel J, et al. Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. PLoS One 2013;8:e83458.
[50] Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Kiefer H, Duranthon V, Jammes H. Breeding animals for quality products: not only genetics. Reproduction. Fertil Development 2016;28:94–111.
[51] Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. Proc Natl Acad Sci United States America 2007;104:19351–6.
[52] Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanatray L, MacLaughlin SM, Kleemann D, et al. Maternal dietary restriction during the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and

down-regulation of the IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. Endocrinology 2013;154:4650–62.
[53] Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanatray L, MacLaughlin SM, Kleemann D, et al. Dietary restriction in the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in increased abundance of angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin type 1 receptor (AT1R) in the absence of changes in ACE or AT1R methylation in the adrenal of the offspring. Reproduction 2013;146:443–54.
[54] Lie S, Sim SM, McMillen IC, Williams-Wyss O, MacLaughlin SM, Kleemann DO, et al. Maternal undernutrition around the time of conception and embryo number each impact on the abundance of key regulators of cardiac growth and metabolism in the fetal sheep heart. J Developmental Origins Health Dis 2013;4:377–90.
[55] Lie S, Morrison JL, Williams-Wyss O, Ozanne SE, Zhang S, Walker SK, et al. Impact of embryo number and periconceptional undernutrition on factors regulating adipogenesis, lipogenesis, and metabolism in adipose tissue in the sheep fetus. Am J Physiology-Endocrinology Metab 2013;305:E931–41.
[56] Lie S, Morrison JL, Wyss O, Zhang S, Ozanne SE, McMillen IC. Periconceptional undernutrition differentially alters insulin signalling in skeletal muscle in singleton and twin fetal sheep in late gestation. Reprod Sci 2012;19:263A.
[57] Lie S, Morrison JL, Williams-Wyss O, Suter CM, Humphreys DT, Ozanne SE, et al. Periconceptional undernutrition programs changes in insulin-signaling molecules and microRNAs in skeletal muscle in singleton and twin fetal sheep. Biol Reprod 2014;90:5.
[58] Edwards LJ, McFarlane JR, Kauter KG, McMillen IC. Impact of periconceptional nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. Am J Physiol 2005; 288:R39–45.
[59] Edwards LJ, McMillen IC. Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002;283:R669–79.
[60] Edwards LJ, McMillen IC. Impact of maternal undernutrition during the periconceptional period, fetal number, and fetal sex on the development of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in sheep during late gestation. Biol Reprod 2002;66:1562–9.
[61] Peugnet P, Robles M, Wimel L, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. Theriogenology 2016.
[62] Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. Reproduction 2004;127:67–77.
[63] Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, et al. Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. PLoS One 2014; 9:e102044.
[64] Tischner M. Maternal influence on pre- and postnatal growth of foals born after embryo transfer. J Reprod Fert 2000;(Suppl. 56): 705–8.
[65] Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale PD, et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. Reproduction 2002; 123:445–53.
[66] Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Stewart F, Ousey J, Ousey J, et al. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. J Endocrinol 2002;172:237–46.
[67] Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. J Endocrinol 2004;181:459–67.
[68] Ousey JC, Rossdale PD, Fowden AL, Palmer L, Turnbull C, Allen WR. Effects of manipulating intrauterine growth on post natal adrenocortical development and other parameters of maturity in neonatal foals. Equine Vet J 2004;36:616–21.
[69] Giussani DA, Forhead AJ, Gardner DS, Fletcher AJW, Allen WR. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. J Physiol 2003;547:67–76.
[70] Peugnet P, Mendoza L, Wimel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, et al. Longitudinal study of growth and osteoarticular status in foals born to between-breed embryo transfers. J Equine Vet Sci 2016;37:24–38.
[71] George LA, Staniar WB, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. Domest Anim Endocrinol 2009. In Press, Corrected Proof.
[72] Van der Heyden L, Lejeune JP, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, et al. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. Vet Rec 2013;172:68.
[73] Peugnet P, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, et al. Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of preweaning horses. PLoS One 2015;10:e0122596.
[74] Soubry A, Hoyo C, Jirtle RL, Murphy SK. A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. BioEssays: News Reviews Molecular, Cellular Developmental Biology 2014;36:359–71.
[75] Ng S-F, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs b-cell dysfunction in female rat offspring. Nature 2010;467:963–7.
[76] Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. Cell 2010;143: 1084–96.
[77] Fullston T, Ohlsson Teague EM, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M, Corbett M, et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. FASEB J 2013;27: 4226–43.
[78] Fullston T, Shehadeh H, Sandeman LY, Kang WX, Wu LL, Robker RL, et al. Female offspring sired by diet induced obese male mice display impaired blastocyst development with molecular alterations to their ovaries, oocytes and cumulus cells. J Assist Reprod Genet 2015.
[79] Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. Hum Reprod 2012;27:1391–400.
[80] Allen WR, Rowson LEA. Transfer of ova between horses and donkeys. 7th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination Munich, Germany; 1972. p. 484–7.
[81] Squires EL, McCue PM. Superovulation in mares. Anim Reprod Sci 2007;99:1–8.
[82] Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. Reprod Domest Anim 2005;40:310–29.
[83] Kraemer DC. A history of equine embryo transfer and related technologies. J Equine Vet Sci 2013;33:305–8.
[84] Perry G. IETS 2013 Statistics and Data Retrieval Committee Report: 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Embryo Transfer Newsl 2013;31:24–46.
[85] Perry G. 2014 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Embryo Transfer Newsl 2015;33:9–18.
[86] Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. J Reprod Fert 1991;(Suppl. 44): 375–84.
[87] Bézard J, Palmer E. In vitro maturation of horse oocytes from slaughtered ovaries. 12th Int Cong Anim Reprod. The Hague; 1992. p. 315–7.
[88] Hinrichs K. Assisted reproduction techniques in the horse. Reprod Fertility, Development 2012;25:80–93.
[89] Anckaert E, Fair T. DNA methylation reprogramming during oogenesis and interference by reproductive technologies: studies in mouse and bovine models. Reprod Fertil Development 2015;27: 739–54.
[90] Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. Rev Reprod 1998;3:155–63.
[91] Sunderam S, Kissin DM, Crawford SB, Folger SG, Jamieson DJ, Warner L, et al. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2012. MMWR Surveill Summ 2015;64:1–29.
[92] Kleijkers SH, van Montfoort AP, Smits LJ, Viechtbauer W, Roseboom TJ, Nelissen EC, et al. IVF culture medium affects postnatal weight in humans during the first 2 years of life. Hum Reprod 2014;29:661–9.
[93] Hart R, Norman RJ. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: part I—general health outcomes. Hum Reprod Update 2013;19:232–43.
[94] Hart R, Norman RJ. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment. Part II—mental health and development outcomes. Hum Reprod Update 2013;19:244–50.
[95] Kallen B, Finnstrom O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO. Cancer risk in children and young adults conceived by in vitro fertilization. Pediatrics 2010;126:270–6.

[96] Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. Hum Mol Genet 2009;18:3769–78.
[97] Amor DJ, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. Hum Reprod 2008;23:2826–34.
[98] Lavara R, Baselga M, Marco-Jiménez F, Vicente JS. Long-term and transgenerational effects of cryopreservation on rabbit embryos. Theriogenology 2014;81:988–92.
[99] Saenz-de-Juano MD, Marco-Jimenez F, Schmaltz-Panneau B, Jimenez-Trigos E, Viudes-de-Castro MP, Penaranda DS, et al. Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. Reproduction 2014;147:789–801.
[100] Boissonas C, El Abdalaoui H, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut IG, et al. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. Eur J Hum Gen 2010;18:73–80.
[101] Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. Hum Mol Genet 2010;19:36–51.
[102] van Montfoort AP, Hanssen LL, de Sutter P, Viville S, Geraedts JP, de Boer P. Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance. Hum Reprod Update 2012;18:171–97.
[103] Gu L, Liu H, Gu X, Boots C, Moley KH, Wang Q. Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. Cell Mol Life Sci 2015;72:251–71.
[104] Franciosi F, Goudet G, Tessaro I, Papillier P, Dalbies-Tran R, Reigner F, et al. In vitro maturation affects chromosome segregation, spindle morphology and acetylation of lysine 16 on histone H4 in horse oocytes. Reprod Fertil Dev 2015.
[105] Goudet G, Belin F, Bezard J, Gerard N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in-vitro maturation in the mare. Mol Hum Reprod 1998;4:563–70.
[106] Hendriks WK, Colleoni S, Galli C, Paris DBBP, Colenbrander B, Roelen BAJ, et al. Maternal age and in vitro culture affect mitochondrial number and function in equine oocytes and embryos. Reprod Fertil Development 2015;27:957–68.
[107] Hinrichs K. The equine oocyte: factors affecting meiotic and developmental competence. Mol Reprod Development 2010;77:651–61.
[108] Hinrichs K. Update on equine ICSI and cloning. Theriogenology 2005;64:535–41.
[109] Johnson AK, Clark-Price SC, Choi YH, Hartman DL, Hinrichs K. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004-2008). J Am Vet Med Assoc 2010;236:983–90.
[110] Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. Anim Reprod Sci 2007;98:39–55.
[111] Choi YH, Ross P, Velez IC, Macias-Garcia B, Riera FL, Hinrichs K. Cell lineage allocation in equine blastocysts produced in vitro under varying glucose concentrations. Reproduction 2015;150:31–41.
[112] Meyers-Brown G, Bidstrup LA, Famula TR, Colgin M, Roser JF. Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. Anim Reprod Sci 2011;128:52–9.
[113] Bastos HBD, Rodrigues MF, Santos GD, Mattos RC, Neves AP, Rubin MIB, et al. Morphologic development and morphometry of the germinative cells of equine foetal ovaries. Reprod Domest Anim 2012;47:496 (abstract).

Revue 5 : The developmental origins of health and disease: importance for animal production

Pascale Chavatte-Palmer, Christophe Richard, Pauline Peugnet, **Morgane Robles**, Delphine Rousseau-Ralliard, Anne Tarrade

Animal Reproduction, 2015, 12;3:505-520

Anim. Reprod, v.12, n.3, p.505-520, Jul./Sept. 2015

The developmental origins of health and disease: importance for animal production

P. Chavatte-Palmer, C. Richard, P. Peugnet, M. Robles, D. Rousseau-Ralliard, A. Tarrade

INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France.

Abstract

The importance of management of pregnant animals during pregnancy has been long known to have effects on the quality of their offspring products. In this review, after defining and setting up the current understanding of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), effects on traits relevant to animal production, such as meat quality and lactation as well as general health are discussed, with a special interest for effects of periconceptional nutrition.

Keywords: animal production, DOHaD, fetal programming, lactation, meat.

Introduction

Animal management during pregnancy has been long known to have effects on the quality of offspring products. In this review, after explaining the current understanding of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), effects on traits relevant to animal production, such as meat quality and lactation as well as general health are discussed, with a particular interest for the effects of periconceptional nutrition. Since effects on reproductive function have been recently widely reviewed (Gardner *et al*., 2009; Chadio and Kotsampasi, 2014; Chavatte-Palmer *et al*., 2014; Kenyon and Blair, 2014), effects on offspring reproductive function have not been developed as the reader can refer to these reviews. Post-natal management will not be discussed thoroughly as this goes beyond the objectives of this review, but maternal environment impact on offspring's phenotype at adulthood will be.

Principles of the developmental origins of health and disease

In the 90's, Barker and co-workers' epidemiological studies underlined an increased risk of non-communicable metabolic diseases in people born Small-for-Gestational Age (SGA) and/or with a poor growth rate in infancy (Barker and Osmond, 1986; Hales *et al*., 1991; Barker, 1992). These observations, referred to as "Fetal programming", suggested that fetal and neonatal adaptations to a nutritionally poor environment induced permanent adaptations leading to a "thrifty phenotype", where the restricted individual favors energy storage and insulin resistance throughout his life. Such early and long-lasting adaptations increase the risk of developing metabolic pathologies at adulthood in the presence of excess food intake, often described as an "energy mismatch" between early life and adulthood (Hales and Barker, 1992, 2001). Subsequently, the concept of the "Predictive Adaptive Response" stated that cues about environment delivered during pregnancy to the developing organism could also induce adaptive responses that would favor long term survival in a similar environment but may be less favorable for survival in a different environment (Bateson *et al*., 2004). This plasticity could provide an evolutionary advantage in the case of environments that change over a few generations but be deleterious in case of even faster changes, when the environment is very different between fetal and post-natal life (Gluckman *et al*., 2009). Moreover, more recent focus on obesity has shown that excess maternal body weight and adiposity also induced fetal adaptations leading to adverse outcomes at adulthood that are curiously close to that observed with growth retardation.

It is now generally admitted that components of human obesity, type-2 diabetes (T2D) and hypertension, but also bone health (Goodfellow *et al*., 2010), psychiatric health (Khandaker *et al*., 2012) and fertility (Faure *et al*., 2015) take root during early development, throughout gestation and lactation, as stated in the "Developmental Origins of Health and Disease" (DOHaD) hypothesis (http://www.mrc.soton.ac.uk/dohad/). Indeed, many studies in humans and animals have demonstrated that an individual's nutritional and hormonal status during fetal development and early life plays an important role for his long-term control of energy metabolism (Barker, 1995; McMillen *et al*., 2008). Epidemiological and experimental reports indicate that epigenetic mechanisms are the link between early life events and health later in life, with epigenetic marks being considered as long-lasting environmental cues (Gabory *et al*., 2011). Animals are affected by this process, which can also affect traits related to production, such as lactation, meat quality and other production traits (Wu *et al*., 2006; Kenyon and Blair, 2014; Fig. 1).

[1]Corresponding author: pascale.chavatte@jouy.inra.fr
Phone : +33(1)3465-2558
Received: May 16, 2015
Accepted: July 3, 2015

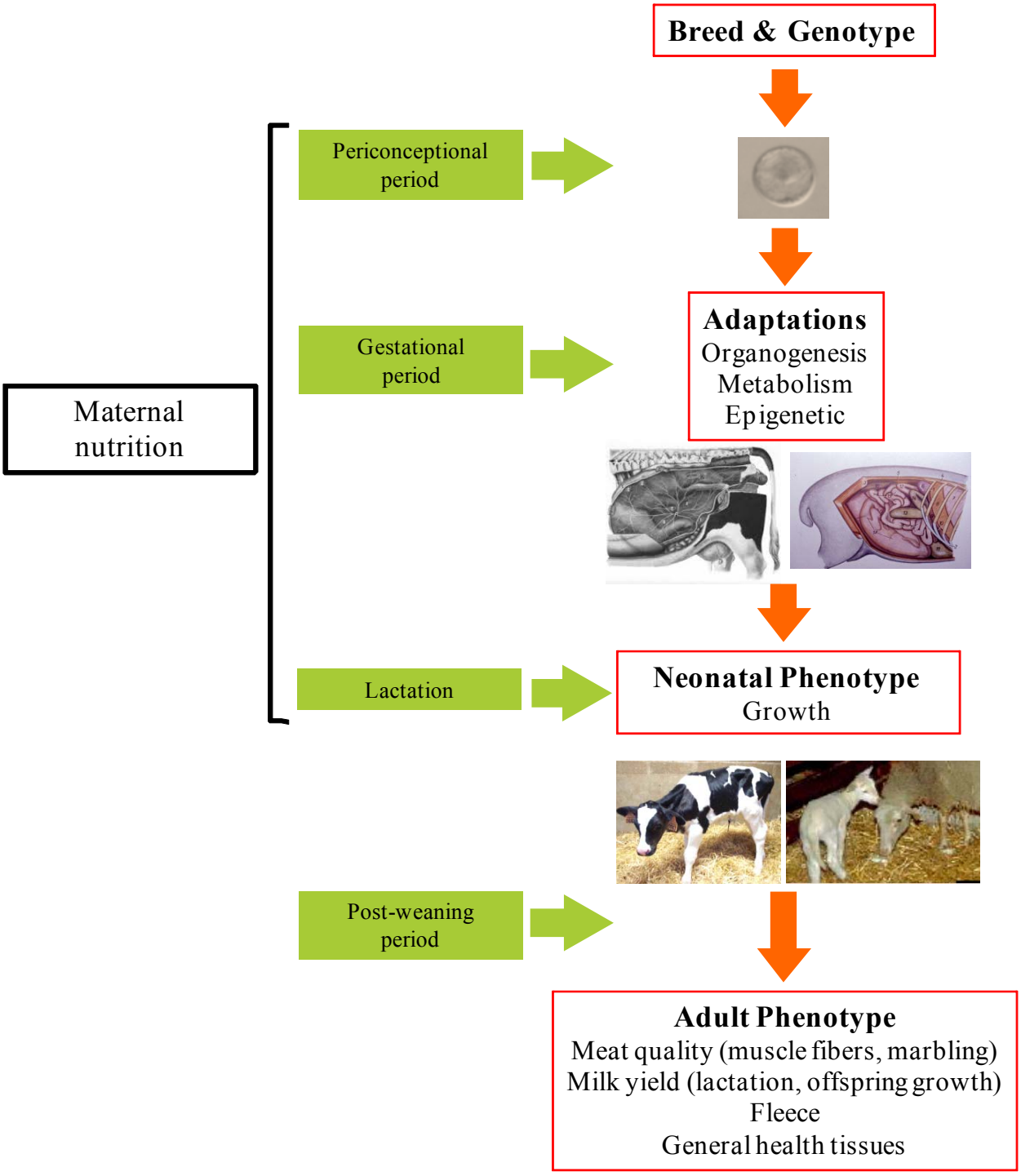


Figure 1. Principles of the developmental origins of health and disease.

DOHaD and the quality of products

It is only recently that studies have started to explore the effects of maternal nutrition during pregnancy on livestock performance in mammals. Although considerable effort has been directed towards defining nutrient requirements of animals over the past 30 years, suboptimal nutrition during gestation remains a significant problem for many farm animal species as well worldwide (including cattle, pigs, and sheep; Wu *et al*., 2004). Ruminants have been the main focus of research, but data in pigs, rabbits and horses also exist. Major observed effects, as detailed below, are summarized in Fig. 2.

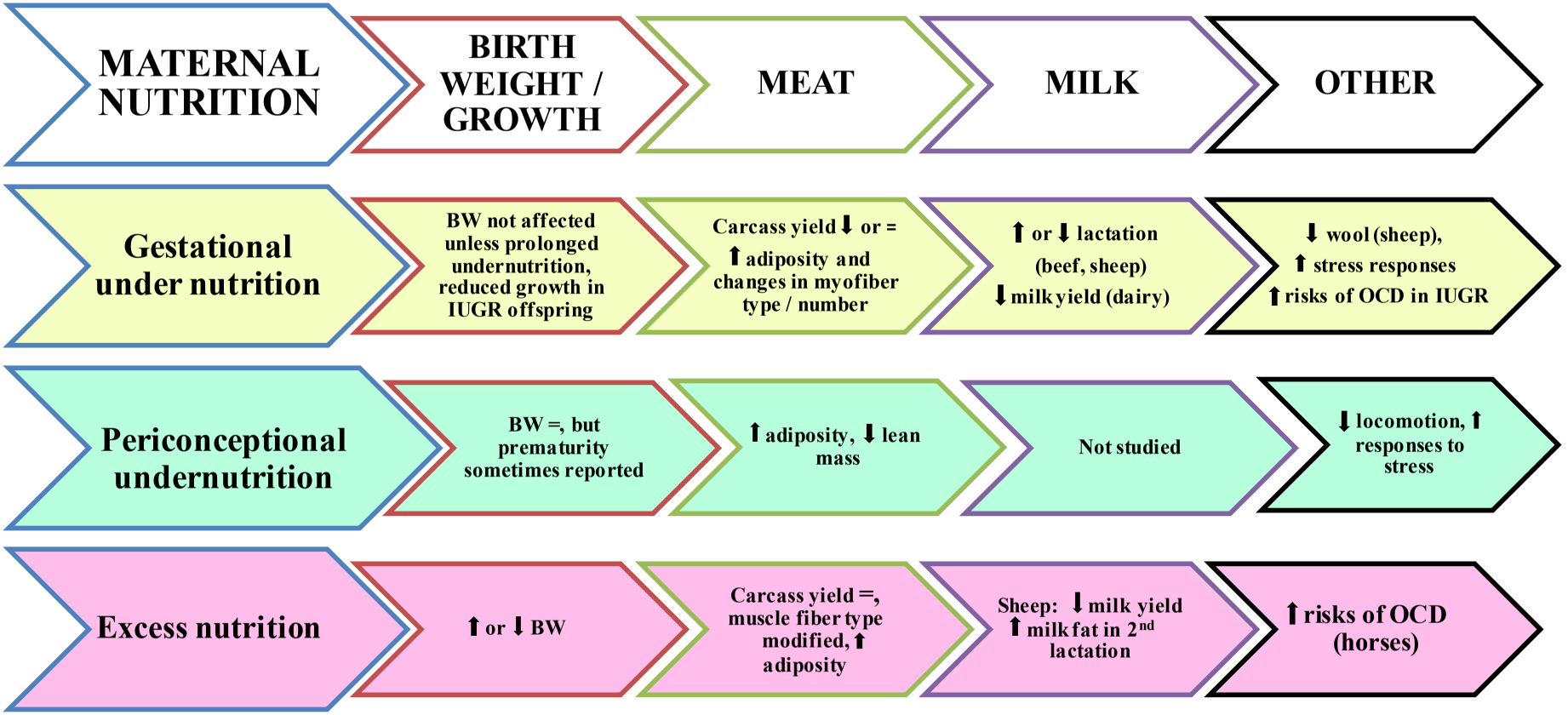


Figure 2. Main effects observed on production traits after maternal undernutrition or overnutrition during gestation, or after periconceptional undernutrition. BW = birthweight; IUGR = intra-uterine growth retardation; OCD = osteochondrosis.

Growth

Growth and attainment of adult size is essential for production. Adult size is dependent on the genetics of the individual, but will be modulated by nutrition and environmental parameters at large. Already in the 1970's, McCance and Widdowson demonstrated that "critical periods" of undernutrition in the prenatal or immediate post-natal period can lead to growth retardation that cannot be recovered by subsequent catch-up growth (McCance, 1976). More studies using animal models have shown how intra-uterine growth restriction and post-natal under-nutrition can restrict offspring size as adults (Desai *et al*., 2005; Bieswal *et al*., 2006). In ruminants, undernutrition during the first half of gestation, although birth weight was usually not affected, was shown to impact metabolic function of sheep and cattle offspring, resulting in altered production and body composition later in life (Ford *et al*., 2007; Long *et al*., 2010, 2012). Undernutrition of ~75% of recommended allowance during early stages of pregnancy compromises placental angiogenesis, cotyledon weight, and thus, fetal development (Zhu *et al*., 2007), with significant impact on development and function of liver and pancreas (Symonds *et al*., 2010). Overnutrition can also restrict placental and fetal development, resulting in decreased birth weights, post-natal growth, and altered body composition (Caton *et al*., 2007). Protein imbalance, with dams either nutrient restricted or supplemented with proteins, affects the development of the fetus through gestation, driving to born-too-thin or overweight neonates, respectively, both in bovine and ovine models (Funston *et al*., 2010).

Beef cattle - In order to reduce fetal growth, severe maternal undernutrition is required for at least a third or half of pregnancy in beef cattle (Greenwood and Cafe, 2007; Martin *et al*., 2007). Fetal growth restriction, however, may also result from twinning, excess heat and is observed in heifers as opposed to multiparous animals (Greenwood and Cafe, 2007). Intra-uterine growth retardation (IUGR) due to maternal food restriction throughout gestation (difference of 10 kg at birth) was shown to lead to reduced post-natal growth (Greenwood and Cafe, 2007). Moreover, undernutrition during the last third of pregnancy will decrease birth weights with a potential negative impact on long-term growth and body composition of the progeny (Underwood *et al*., 2010).

Dairy cattle - While growth (2 years old cows) and milk production of the dam have clear implications for development of the fetus (Banos *et al*., 2007), diet during pregnancy is the primary modifiable factor that has a substantial influence on body condition and energy status of the dairy cattle as well as viability and body composition of newborn calves. Like in beef cattle, reduced post-natal growth was observed in naturally occurring low birth weight Holstein calves (Swali and Wathes, 2006).

Sheep - Effects of maternal dietary level and timing in sheep have been recently very thoroughly reviewed (Kenyon and Blair, 2014). Like in cattle, maternal undernutrition generally does not reduce birth weight, although offspring may be lighter at weaning, in particular when undernutrition has been prolonged until term (Kelly *et al*., 1996, 2006; Field *et al*., 2015). Variation in the effects of undernutrition may also depend on the breed, or genetic / epigenetic background. Indeed, maternal undernutrition from 28 et 78 days of pregnancy did not reduce fetal weight in "Baggs" ewes which originated form a nomadic herd living in harsh conditions, whereas reduced fetal weight was observed in ewes bred for several generations in good conditions at the University of Wyoming (Vonnahme *et al*., 2006). These differences were accompanied with different placental responses to undernutrition, with earlier placental maturation in the "Baggs" ewes (Vonnahme *et al*., 2006). Heat stress during pregnancy also induces IUGR in sheep (Barry *et al*., 2008). In the field, the combination of maternal heat stress and undernutrition during pregnancy reduces lamb birth weight in ewes, which seem to better adapt to restricted feeding than to thermal stress (Sejian *et al*., 2011).

Overfeeding may also be harmful. As a result of dietary induced obesity in ewes, fetuses at mid-gestation were macrosomic, hyperglycemic, hyperinsulinemic with markedly increased pancreatic weight and β-cell numbers compared with fetuses of ewes fed to requirements (MacLaughlin *et al*., 2005; George *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2011a). Although they were still hyperglycemic at birth, the insulin secretion was blunted with decreased pancreatic growth and β-cell numbers by the end of gestation (Zhang *et al*., 2011a).

Horse - In the horse, fetal growth is limited mainly by the uterine size of the dam, as shown by experiments using artificial insemination or embryo transfer in horses of different size (Walton and Hammond, 1938; Tischner, 2000; Allen *et al*., 2002, 2004; Peugnet *et al*., 2014, 2015b). These works have demonstrated the importance of fetal growth for the achievement of the expected adult size, with growth retarded foals being permanently affected in terms of growth, at least for some bone segments. This is of particular importance in these species, where reduced adult size will limit access to studbooks and to some sporting events, and may affect performance. Similar experiments in sheep indicate that these effects on birth weight are not driven by changes in maternal insulin sensitivity during pregnancy (Oliver *et al*., 2015).

In the horse, similar to what was described in sheep, maternal overnutrition is reported to reduce glucose uptake and reduce growth rate of two thirds of pregnancy (Satterfield *et al*., 2010). In equidae, however, maternal undernutrition does not seem to affect birthweight nor subsequent growth, at least until

weaning (Wilsher and Allen, 2006; Ousey *et al*., 2008; Peugnet *et al*., 2015a), which does not preclude effects on performance (Rossdale and Ousey, 2003).

Meat quality

Meat quantity depends on the muscle mass whereas meat quality will depend on muscle fibers, which play an important role for tenderness (Guillemin *et al*., 2009) and the intramuscular fat, which is a major component of flavor. Different levels of intramuscular fat will be looked for according to cultures and cooking traditions.

The fetal period is crucial for skeletal muscle development, because no net increase in the number of muscle fibers occurs after birth in farm animals (Greenwood *et al*., 2000; Nissen *et al*., 2003). Myogenesis takes place during several chronologically distinct phases occurring in fetal life: proliferation of precursor cells (myoblasts), fusion of myoblasts into differentiated multinuclear cells (myotubes), and differentiation of these cells into muscle fibers. Myotube formation gives rise to primary and secondary muscle fibers, respectively. Muscle fiber generations are set up around the last third of gestation in larger species - day 180 in cattle (term = 280-284 days), around 90 days in pigs (term = 115 days) and in the early post-natal period in less mature species such as rabbits (first month after birth) and there is no increase in muscle fibers thereafter (Stickland, 1978; Picard *et al*., 2002; Oksbjerg *et al*., 2004). Therefore, a reduction in the number of muscle fibers during fetal development will lead to reduced muscle mass in the adult. Fiber type is also important for production: slow oxidative fibers (Type I) originate from primary muscle fibers, and fast, type II myofibers, which mostly develop from secondary fibers, mature into type IIA (fast-oxidative glycolytic) or IIB (fast-glycolytic) fibers. Type II fibers are more efficient in terms of growth (Du *et al*., 2010), but oxidative, and more so, slow oxidative fibers, are generally more likely to produce more tender meat, although there are clear discrepancies between different muscles (Guillemin *et al*., 2009).

Intramuscular fat (marbling) is dependent on the presence of intramuscular adipocytes. Adipocytes originate primarily from mesenchymal cells in fetal life around mid-gestation at the same time when secondary muscle fibers are produced (Du *et al*., 2010), but ontogenesis still needs to be completely elucidated (Boone *et al*., 2000; Hocquette *et al*., 2010), although intramuscular adipogenesis can be modified through maternal nutrition during pregnancy in sheep (Tong *et al*., 2008). Triglycerides are initially stored within the muscle fibers and then, in the immediate postnatal period, intramuscular adipocytes will increase in size and volume (Hocquette *et al*., 2010). The hyperplasia of adipocytes is an important factor for marbling during growth (Hocquette *et al*., 2010).

Maternal undernutrition

Beef cattle - Severe maternal undernutrition leading to fetal growth restriction in beef cattle significantly reduces postnatal growth compared to controls but was not shown to affect muscle fiber characteristics, carcass composition and retail yield at similar carcass weight (Greenwood and Cafe, 2007). In regions where droughts are common, however, cows may experience periods of undernutrition during pregnancy, which may affect meat quality. Traditionally, they are supplemented in late gestation but not earlier (Du *et al*., 2010). In these harsh conditions, protein supplementation of pregnant cows in mid-gestation (day 60 to 180), or improvement of the pastures through irrigation, however, was shown to increase lean growth and reduce fat in offspring (Du *et al*., 2010). In a study using Angus x Gelbvieh cattle, Long *et al*. (2012) found no effect of maternal global undernutrition with or without protein supplementation during the first half of pregnancy on body weight or organ weight at slaughter (around 1.5 years of age). The ratio of semitendinosus muscle to carcass weight, however, tended to be reduced in the offspring from non-supplemented undernourished dams, with average adipocyte size increased in several anatomical locations (Long *et al*., 2012). The effect of increased or reduced maternal protein intake on offspring skeletal muscle development, however, is dependent on the timing of the supplementation during pregnancy as well as the sex of the offspring, as demonstrated in beef heifer offspring (Micke *et al*., 2011): as adults, males born to heifers fed a low protein diet during the first trimester of pregnancy and subsequently a high protein diet had greater *longissimus dorsi* muscle cross-sectional area compared to those whose dams were exposed to continuous high protein diet, whereas there was no effect of maternal protein intake on the female offspring. In contrast, maternal protein restriction in the second trimester was associated with higher *longissimus dorsi* muscle cross-sectional area in male and female offspring (Micke *et al*., 2011) although there was no effect on the *longissimus dorsi* weight/carcass weight ratio (Micke *et al*., 2010). These changes were associated with changes in the muscle expression of insuline-like growth factors IGF1 and IGF2 and their receptors (Micke *et al*., 2010, 2011).

Dairy cattle – In dairy cattle, conception usually takes place during early lactation, and thus lactating dams are in relative energy deficit compared to non-lactating dams (Funston and Summers, 2013). In a retrospective study of more than 1500 dairy calves, the size of the dam and its milk yield were shown to be the two most important factors influencing birth weight, with lower birth weights of calves born to high yielding cows with similar body size (Kamal *et al*., 2014). When heifers and cows were compared in a small number of Holstein females, maternal parity did not affect girth,

birthweight nor glucose metabolism in the first month post-partum, although the birthweight and withers height of first born calves were reduced (Bossaert *et al*., 2014).

Sheep - In sheep, several studies indicate that maternal undernutrition in the early stages of pregnancy can affect meat quality, although birth weight is not always affected (Kenyon and Blair, 2014). Indeed, an extended period of maternal nutrient restriction during the first half of gestation results in relatively normal birth weights, but leads to increases in the length and thinness of the neonates, increased adiposity, and suppressed glucose tolerance (Whorwood *et al*., 2001; Ford *et al*., 2007). Moreover, carcass weight quality appears to be affected more by genetic background and litter size at birth than by maternal nutrition, except when undernutrition lasts most of the gestation (Kenyon and Blair, 2014). Indeed, the placenta adapts to the nutritional environment to minimize nutritional consequences to the fetus, although the extent of its adaptive capacities depend on the timing and intensity of the nutritional insult (Fowden *et al*., 2008; Symonds *et al*., 2012).

Restricted fetal nutrition throughout gestation as experienced by ewes during twin pregnancies leads to increased fetal adiposity (Edwards *et al*., 2005). Undernutrition of twin-bearing ewes throughout pregnancy led to low-birthweight lambs that remained smaller until adolescence and had poor energetic efficiency (Husted *et al*., 2007). Moreover, offspring were shown to have disturbed responses to fasting at 6 months of age in terms of leptin (reduced), IGF1 and cortisol (increased; Kongsted *et al*., 2013). When low (mean 2.29 kg) and high (mean 4.84 kg) birthweight lambs were compared, although the weight of the *semitendinosus* muscle was very significantly decreased in low birthweight lambs, the number of myofibers was similar but the fact that low birthweight lambs did not catch up in muscle growth may be due to the reduced myonuclei number (Greenwood *et al*., 1998, 2000).

Like in cattle, however, the timing of undernutrition matters and numerous nutritional planes have been studied, using animals of different breeds, making comparisons rather difficult (Kenyon and Blair, 2014). If most undernutrition studies do not indicate a strong effect on post-weaning liveweight, higher adiposity has been sometimes observed (Kenyon and Blair, 2014). In ewes undernourished in early gestation, term fetuses had more adipose tissue compared to controls that were fed *ad libitum* (Bispham *et al*., 2003), which is associated with increased glucocorticoid sensitivity (Gnanalingham *et al*., 2005; Mostyn and Symonds, 2009). In another study, castrated males at 8 months of age born to white face dams that were nutritionally restricted to 50% of requirements from day 28 to 78 of pregnancy had heavier carcass weight than controls, but intra-abdominal fat deposits were also heavier and intramuscular triglyceride contents were increased as a result of the reduction of the activity of carnitine palmitoyltransferase-1, which is involved in fatty-acid oxidation (Zhu *et al*., 2006; Ford *et al*., 2007). Moreover, the total number of muscle myofibers was decreased with an increased ratio of IIB fibers (fast-glycolytic fibers) in muscle (Zhu *et al*., 2006). Similar findings were observed in another study where only twin animals were selected, with males and females analyzed separately (Daniel *et al*., 2007). This is an important point, as clear differences have been shown according to sex and litter size for many physiological parameters (MacLaughlin *et al*., 2010; Tarrade *et al*., 2015).

Pigs - In pigs, moderate IUGR is not always associated with a modification in carcass composition but very small piglets have slower growth and fatter carcasses than controls (Powell and Aberle, 1980; Mostyn and Symonds, 2009; Morise *et al*., 2011). Low birthweight piglets are also characterized by a reduced number of enlarged myofibers (Rehfeldt and Kuhn, 2006). Maternal undernutrition of Large White sows from mating to 50 days of pregnancy did not affect carcass weight, lean tissue and adipose tissue yield in offspring, whereas the composition of muscle in terms of myofiber types was slightly affected, with a reduced percentage of type IIB fibers (Bee, 2004). Maternal protein restriction, however, was shown to reduce the lean and increase the fat contents of offspring at 6 months of age with a tendency for reduced number of muscle myofibers associated with reduced expression of IGF2 mRNA (Rehfeldt *et al*., 2012).

Iberian pigs, which are genetically different form modern commercial pigs, deposit more intramuscular fat and are naturally leptin resistant (Ovilo *et al*., 2005; Munoz *et al*., 2009), presenting what resembles a "thrifty phenotype", which has been attributed to centuries of adaptation to low quality nutrition in semi-feral conditions (Lopez-Bote, 1998). In this breed that is prone to obesity, maternal undernutrition during pregnancy reduces birthweight and increases the incidence of IUGR piglets in the litter (Gonzalez-Bulnes *et al*., 2012). Female offspring appear to catch-up growth to controls at weaning whereas males are still growth-retarded at weaning (Gonzalez-Bulnes *et al*., 2012).

Excess maternal nutrition and obesity

Sheep - Extensive studies have shown that excess maternal nutrition retards placental and fetal growth, and increases fetal and neonatal mortality in sheep (Wallace *et al*., 2003). Excess maternal nutrition increases mid-gestation fetal weight (Ford *et al*., 2009). Lamb birth weight is similar to controls (Wallace *et al*., 2005; Zhu *et al*., 2009) or increased (Kenyon *et al*., 2011) according to the extent of the overfeeding and breed, but subsequent growth is similar (Kenyon *et al*., 2011). Maternal obesity, however, down-regulates

myogenesis through the Wnt/β-catenin signaling pathway (Tong *et al*., 2009).

Pigs - In pigs, excess maternal nutrition from mating to 50 days of pregnancy increased the adipose tissue yield in the offspring carcasses, without affecting overall carcass weight and lean yield, although muscle fiber type was modified (Bee, 2004). In another study, both reduced (50%) and excess (250%) maternal protein intake during pregnancy reduced piglet birthweight and birthweight/crown-rump length, reflecting adiposity (Rehfeldt *et al*., 2011). These effects, however, were not observed in fetuses at mid-pregnancy, indicating that placental insufficiency leading to IUGR had occurred in the second half of pregnancy (Rehfeldt *et al*., 2011). Offspring of dams fed a protein excess, however, did not differ from controls for muscle myofiber numbers and adipose tissue at 6 months of age (Rehfeldt *et al*., 2012).

In conclusion to this chapter, the favored fat development and reduced number in muscle myofibers mostly observed in maternal undernutrition experiments have been associated with changes in expression of insulin-like growth fators (IGFs; Micke *et al*., 2011), Growth hormone (Rehfeldt and Kuhn, 2006), transcription factors involved in adipogenesis such as the Peroxisome Proliferator-Activited receptor gamma (PPARγ; Tong *et al*., 2008, 2009) and nutrient sensors such as mTOR. Indeed, the main regulators of adipogenesis are the peroxisome proliferator activated receptor (PPARγ) and CCAAT -enhancer binding protein (C/EBP; Hausman *et al*., 2009). Moreover, fetal fat development may be favored by disturbed maternal plasma cortisol (reduced in undernourished pregnant sheep (Debus *et al*., 2012) or increased in pregnant sows fed a low protein diet (Otten *et al*., 2013)) observed during nutritional restrictions (Symonds *et al*., 2012).

Lactation

So far, the amount of data on the fetal programming of offspring lactation through the manipulation of maternal nutrition in domestic animals remains limited. Hence, in this part, the effects of under and over-nutrition are treated together. The organogenesis of the mammary gland begins early in pregnancy (Hovey *et al*., 2002; Houdebine, 2003) and may therefore be affected by maternal nutrition like other organs.

Beef cattle - In beef cattle, slower growing female calves whose dams have poor lactations tend to produce better lactation when they are adults and have offspring with faster growth, which in turn have reduced quality lactation as adults (Koch, 1972; Pala and McCraw, 2005).

Dairy cattle - In dairy cattle, the analysis of data available on the UK national fertility database and from Irish dairy cows showed that offspring from dams producing more milk before and during conception had reduced milk yields, increased somatic cell count and were culled earlier compared to those born to dams with lower milk yields (Banos *et al*., 2007; Berry *et al*., 2008). Similar observations were made in Spain, which showed that females born to dams that were lactating during early pregnancy produced significantly less milk compared to those born to dams that were not lactating and that this reduction in milk production was correlated to maternal production (Gonzalez-Recio *et al*., 2012).

Sheep - Kenyon and Blair (2014) have reviewed the effects of maternal nutrition on milk production in sheep. Maternal undernutrition from day 21 to 50 was shown to reduce the mammary gland weight in fetuses near term (Martín *et al*., 2012) and reduce milk production at first lactation (Paten *et al*., 2013). In contrast, fetal mammary duct density and fat production in milk in the second lactation was increased in female sheep born to dams that were fed *ad libitum* during pregnancy (1.5 times maintenance) compared to those born to control dams fed to maintenance (Blair *et al*., 2010). Nevertheless, the mammary mass was increased in the offspring of the maintenance group, and these offspring produced more protein and lactose, only in the first lactation at 2 years of age (Blair *et al*., 2010). The authors suggest that these effects limited to the first lactation may be the result of an "Adaptive Predictive Response", as defined above, where the "restricted" offspring would favor the survival of their own first offspring, with no investment in further lactations when the survival of the individual would be more hazardous. As a consequence, second generation effects were hence observed in two studies where grand-daughters of ewes fed a moderate diet during pregnancy were heavier at birth compared to the grand-daughters of dams that were fed *ad libitum* during pregnancy (van der Linden *et al*., 2009; Blair *et al*., 2010). Interestingly, this effect was confirmed in farmed minks bred for fur, when grand-mothers were protein restricted (Matthiesen *et al*., 2010).

Fleece

Fleece weight in sheep is affected by body size, which induces confounding factors for the analysis of maternal effects of this parameter and may explain why a reduction in fleece has been reported in response to maternal undernutrition (Schinckel and Short, 1961; Kenyon and Blair, 2014). One study reported a change in hair follicle number, however, which could persist throughout the life of the animal (Schinckel and Short, 1961).

General health issues

Thermogenesis - In the newborn sheep, brown adipose tissue (BAT, representing 1-2% of birthweight; Symonds and Lomax, 1992) is essential for ensuring effective adaptation to the extrauterine environment, in

particular thermogenesis. Neonatal pigs and horses, although they possess BAT (Ousey, 1997; Mostyn *et al*., 2014), are much more dependent on shivering thermogenesis to maintain heat production during cold exposure. Gestational BAT development depends on transplacental glucose supply to the fetus (Symonds *et al*., 2012). In contrast to rodents, brown fat, although present at birth, is very reduced in adult large animals as most BAT is progressively replaced by white fat (Symonds *et al*., 2012). Moreover, it may not have the same myoblastic origin as white fat (Budge *et al*., 2009).

Behavior – Few studies have focused on the impact of maternal nutrition on offspring behavior in large animals, although alterations in food intake and response to stress may be important to the breeding industry.

Food restriction in late gestation in sheep was shown to decrease voluntary milk intake in lambs from 3 to 60 days of age (Geraseev *et al*., 2006) whereas, in another study, feed intake was not affected after weaning (Sibbald and Davidson, 1998). In dairy goats, no effects were observed in feeding behavior and stress responses in male kids before weaning (Laporte-Broux *et al*., 2011). Although no effects on feeding behavior in females at one year of age, at 2 years of age, the cortisol response to ACTH injection was increased in offspring from restricted dams, suggesting a higher susceptibility to stress (Laporte-Broux *et al*., 2012). Similarly, in pigs born to dams fed a low protein diet during pregnancy, cortisol response to weaning was increased and the medulla area within the adrenal was increased (Otten *et al*., 2013).

Osteoarticular pathology - In horses, although maternal undernutrition does not affect birth weight, epidemiological and experimental data indicate that IUGR due to transfer of saddle embryos into ponies (Peugnet *et al*., 2014), but also feeding mares with concentrates during gestation (Van der Heyden *et al*., 2013; Peugnet *et al*., 2015a), may be associated with an increased risk of developing lesions of osteochondrosis in their foal, which is of strong economical importance for the horse industry. Since osteochondrosis is related to glucose/insulin metabolism, the effects may be linked to the observed trend for a reduced insulin sensitivity at 5 days of age in offspring of mares fed a high starch diet (George *et al*., 2009). More work is currently on-going in the authors' laboratory to explore this phenomenon.

Periconceptional programming

The developmental plasticity of embryos in the pre-implantation period leads to different embryo, feto-placental and post-natal responses to the environment (Laguna-Barraza *et al*., 2012). Specific targeting of the periconceptional period for experiments on maternal nutrition in large animals use different timing for the nutritional challenge, making it difficult to draw comparisons, although there are a lot of data available in model species and humans, which have been reviewed elsewhere (Watkins *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2011b; Fleming *et al*., 2012; van Montfoort *et al*., 2012; Steegers-Theunissen *et al*., 2013; Lane *et al*., 2015). Experiments using embryo transfer between a nutritionally challenged oocyte or embryo donor have also provided valuable insight into periconceptional effects. So far, most data on farm animals have been generated in sheep.

Using embryo transfer, it was shown that B12 vitamin and folate deficiency in embryo donor ewes and transfer of these embryos in control females induces excess weight and adiposity in sheep offspring, insulin resistance, increased blood pressure and altered response to immunological challenges, as well as differences in liver methylation (Sinclair *et al*., 2007). The transfer of embryos, collected from restricted or obese ewes maintained in the same nutritional plane or induced to loose or gain weight in the last month before mating and for the pre-implantation period, into control recipients, showed that maternal restriction in the periconceptional period, regardless of previous nutritional status, resulted in adrenocortical hypertrophy (Zhang *et al*., 2013b) together with changes in the renin-angiotensin system regulation within the adrenal (Zhang *et al*., 2013a). Periconceptional undernutrition was shown to induce an increment in the body weight and the oocyte population of the offspring, as well as an alteration of their locomotor activity (Abecia *et al*., 2014).

Like for general nutrition, the effects of maternal undernutrition around conception vary depending on the number of implanted embryos. First, maternal weight loss as a result of periconceptional undernutrition in sheep has been shown to reduce twinning rate (MacLaughlin *et al*., 2005; Debus *et al*., 2012; Abecia *et al*., 2014). In general, birth weight is not directly affected by periconceptional nutrition. Indeed, uterine blood flow is increased by 13% in ewes that were undernourished during the periconceptional period compared to controls (Rumball *et al*., 2008) with increased expression of growth factors (Zhu *et al*., 2007).

Effects of periconceptional (-60 days before to 7 days after conception) or pre-implantation (0-7 days after conception) nutrition were observed on fetal skeletal muscle insulin signaling, lipogenesis, adipose tissue and liver metabolism as well as miRNA expression, depending on twin or singletons pregnancy (Lie *et al*., 2012, 2013, 2014). The timing and importance of fetal pre-partum ACTH and cortisol increases as well as gestational length were shown to differ depending on embryo number, with reduced gestation duration only in singletons (Edwards *et al*., 2002, 2004; Edwards and McMillen, 2002; Bloomfield *et al*., 2003). These effects may be related to the increased weight and disturbed function in the adrenal

observed in singletons in these and other studies (Connor *et al*., 2009; Williams-Wyss *et al*., 2014). Responses to glucocorticoids are also affected: hypothalamic glucocorticoid receptor promoter methylation, as well as gene and protein expression, were still observed in 5 year old male and female offspring, which could explain the increased obesity observed in these animals (Begum *et al*., 2013). Regardless of singleton or twin status, the cardiovascular function was impaired in adult sheep (Gardner *et al*., 2004; Torrens *et al.,* 2009).

Twins are generally smaller than singletons. Using an elegant approach of fetal reduction during pregnancy, Hancock *et al*. (2012) have shown that twins had lower lean mass and higher fat mass until 2 years of age compared to their contemporary singletons. Twin reduction to singleton pregnancy at 42-43 days of gestation did not recover the programmed twin fat and lean mass phenotype, indicating the early origin of these traits (Hancock *et al*., 2012).

As mentioned earlier, the genetic background of the animals induces large differences in the response to undernutrition. For example, gestational length was increased by periconceptional undernutrition only in twin-bearing Welsh mountain ewes carrying fetuses of opposite sex (Cleal *et al*., 2007). In another study, maternal periconceptional undernutrition did not reduce birth weight nor gestational length in the hardy Mediterranean breed Merinos d'Arles (Debus *et al*., 2012). Nevertheless, increased post-natal adiposity was observed in males but not in females, underlining the importance of offspring sex as well as litter size and breed (Debus *et al*., 2012).

In terms of response to post-natal nutritional treatment, it is interesting to observe that maternal nutrition at the time of conception was shown to directly affect lamb responses to nutritional supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA)-enriched diets: offspring of dams fed a high n-6 fatty acid-riched diet for 6 weeks before mating had lower responses to algae supplementation (n-3 PUFA-enriched diet) compared to those born to control dams (Clayton *et al*., 2014).

In terms of behavior, maternal restriction from 60 days before to 30 days after the beginning of pregnancy was reported to be associated with decreased locomotion in 18 month old offspring (Donovan *et al*., 2013) whereas locomotion and attempts to escape were decreased during isolation after maternal periconceptional undernutrition, possibly reflecting decreased responses to stress (Hernandez *et al*., 2010; Abecia *et al*., 2014).

Conclusions

The pre- and periconceptional periods are critical in the context of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). Maternal *in vivo* environment, in particular nutrition, can disturb the apposition of epigenetic marks throughout gametogenesis, fertilization and the first steps of embryonic development, which are times during which major epigenetic changes take place (Jammes *et al*., 2011). These marks will subsequently affect organ function during development, resulting in alterations in the post-natal phenotype (Watkins *et al*., 2008; Watkins *et al*., 2010). The *in vitro* environment, in the case of assisted reproduction techniques, also affects epigenetic marks. Whilst the embryo is a target of these changes, female and male gametes are both target and vector of these epigenetic changes, thus leading to multigenerational effects, so that long-term consequences on the phenotype of offspring vary according to the sex of the vector parent, the sex of the individual and the generation (Aiken and Ozanne, 2014).

More work is needed to understand how the environment modulates the genomic inheritance in order to induce a phenotype and how this may be used in agriculture to lead to more robust animals able to tackle the climatic challenges that we will be facing in the future.

Acknowledgments

PCP, PP, MR and AT are thankful for the funding for the Foetalim project by the Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE). PCP and PP also received funding for projects (Foetalim and sheep periconceptional undernutrition) from INRA, Physiology and Breeeding Systems incitative action. All authors are members of COST actionsCOST Actions FA0702 GEMINI "Maternal Interaction With Gametes and Embryo", FA1201 EPICONCEPT "Epigenetics and Periconception Environment" and BM1308 “Sharing Advances on Large Animal Models (SALAAM)”.

References

Abecia JA, Casao A, Pascual-Alonso M, Lobón S, Aguayo-Ulloa LA, Meikle A, Forcada F, Sosa C, Marín RH, Silva MA, Maria GA. 2014. The effect of periconceptional undernutrition of sheep on the cognitive/emotional response and oocyte quality of offspring at 30 days of age. *J DOHaD*, 5:79-87.

Aiken CE, Ozanne SE. 2014 Transgenerational developmental programming. *Hum Reprod Update*, 20:63-75.

Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale PD, Fowden AL. 2002. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*, 123:445-453.

Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse. III. Postnatal growth.

Reproduction, 127:67-77.

Banos G, Brotherstone S, Coffey MP. 2007. Prenatal maternal effects on body condition score, female fertility, and milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci*, 90:3490-3499.

Barker DJP, Osmond C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 327:1077-1081.

Barker DJ. 1992. The fetal origins of diseases of old age. *Eur J Clin Nutr*, 46(suppl. 3):S3-9.

Barker DJP. 1995. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today*, 1:418-423.

Barry JS, Rozance PJ, Anthony RV. 2008. An animal model of placental insufficiency-induced intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol*, 32:225-230.

Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. 2004. Developmental plasticity and human health. *Nature*, 430(6998):419-421.

Bee G. 2004. Effect of early gestation feeding, birth weight, and gender of progeny on muscle fiber characteristics of pigs at slaughter. *J Anim Sci*, 82:826-836.

Begum G, Davies A, Stevens A, Oliver M, Jaquiery A, Challis J, Harding J, Bloomfield F, White A. 2013. Maternal undernutrition programs tissue-specific epigenetic changes in the glucocorticoid receptor in adult offspring. *Endocrinology*, 154:4560-4569.

Berry DP, Lonergan P, Butler ST, Cromie AR, Fair T, Mossa F, ad Evans ACO. 2008. Negative influence of high maternal milk production before and after conception on offspring survival and milk production in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 91:329-337.

Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C. 2006. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)*, 14:1330-1343.

Bispham J, Gopalakrishnan GS, Dandrea J, Wilson V, Budge H, Keisler DH, Pipkin FB, Stephenson T, Symonds ME. 2003. Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology*, 144:3575-3585.

Blair HT, Jenkinson CMC, Peterson SW, Kenyon PR, van der Linden DS, Davenport LC, Mackenzie DDS, Morris ST, Firth EC. 2010. Dam and granddam feeding during pregnancy in sheep affects milk supply in offspring and reproductive performance in grand-offspring. *J Anim Sci*, 88:E40-E50.

Bloomfield FH, Oliver MH, Hawkins P, Campbell M, Phillips DJ, Gluckman PD, Challis JRG, Harding JE. 2003. A periconceptional nutritional origin for noninfectious preterm birth. *Science*, 300(5619):606.

Boone C, Mourot J, Grégoire F, Remacle C. 2000. The adipose conversion process: regulation by extracellular and intracellular factors. *Reprod Nutr Dev*, 40:325-358.

Bossaert P, Fransen E, Langbeen A, Stalpaert M, Vandenbroeck I, Bols PE, Leroy JL. 2014. Effects of parity and periconceptional metabolic state of Holstein-Friesian dams on the glucose metabolism and conformation in their newborn calves. *Animal*, 8:975-981.

Budge H, Sebert S, Sharkey D, Symonds ME. 2009. Session on 'Obesity'. Adipose tissue development, nutrition in early life and its impact on later obesity. *Proc Nutr Soc*, 68:321-326.

Caton JS, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Luther JS, Lardy GP, Hammer DA, Redmer D, Reynolds LP. 2007. Nutritional management during gestation: impacts on lifelong performance? *In*: 18th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, 2007, Gainesville, FL. Gainesville, FL: UFL/IFAS. 20 pp.

Chadio S, Kotsampasi B. 2014. The role of early life nutrition in programming of reproductive function. *J Dev Orig Health Dis*, 5:2-15.

Chavatte-Palmer P, Debus N, Dupont C, Camous S. 2014. Nutritional programming and the reproductive function of the offspring. *Anim Prod Sci*, 54:1166-1176.

Clayton EH, Lamb TA, Refshauge G, Kerr MJ, Bailes KL, Ponnampalam EN, Friend MA, Hopkins DL. 2014. Differential response to an algae supplement high in DHA mediated by maternal periconceptional diet: intergenerational effects of n-6 fatty acids. *Lipids*, 49:767-775.

Cleal JK, Poore KR, Newman JP, Noakes DE, Hanson MA, Green LR. 2007. The effect of maternal undernutrition in early gestation on gestation length and fetal and postnatal growth in sheep. *Pediatr Res*, 62:422-427.

Connor KL, Bloomfield FH, Oliver MH, Harding JE and Challis JRG. 2009. Effect of periconceptional undernutrition in sheep on late gestation expression of mRNA and protein from genes involved in fetal adrenal steroidogenesis and placental prostaglandin production. *Reprod Sci*, 16:573-583.

Daniel ZC, Brameld JM, Craigon J, Scollan ND, Buttery PJ. 2007. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *J Anim Sci*, 85:1565-1576.

Debus N, Chavatte-Palmer P, Viudes G, Camous S, Roséfort A, Hassoun P. 2012. Maternal periconceptional undernutrition in Merinos d'Arles sheep: 1. Effects on pregnancy and reproduction results of mothers and offspring growth performances. *Theriogenology*, 77:1453-1465.

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. 2005. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288:91-96.

Donovan EL, Hernandez CE, Matthews LR, Oliver MH, Jaquiery AL, Bloomfield FH, Harding JE

2013. Periconceptional undernutrition in sheep leads to decreased locomotor activity in a natural environment. *J Dev Orig Health Dis*, 4:296-299.

Du M, Tong J, Zhao J, Underwood KR, Zhu M, Ford SP, Nathanielsz PW. 2010. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J Anim Sci*, 88:E51-60.

Edwards LJ, Bryce AE, Coulter CL, McMillen IC. 2002. Maternal undernutrition throughout pregnancy increases adrenocorticotrophin receptor and steroidogenic acute regulatory protein gene expression in the adrenal gland of twin fetal sheep during late gestation. *Mol Cell Endocrinol*, 196:1-10.

Edwards LJ, McMillen IC. 2002. Impact of maternal undernutrition during the periconceptional period, fetal number, and fetal sex on the development of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in sheep during late gestation. *Biol Reprod*, 66:1562-1569.

Edwards LJ, McFarlane JR, Kauter KG, McMillen IC. 2004. Impact of maternal undernutrition before and during pregnancy on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. doi: 10.1152/ajpregu.00127.2004.

Edwards LJ, McFarlane JR, Kauter KG, McMillen IC. 2005. Impact of periconceptional nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *Am J Physiol*, 288:R39-R45.

Faure C, Dupont C, Chavatte-Palmer P, Gautier B, Levy R, Group AC. 2015. Are semen parameters related to birth weight? *Fertil Steril*, 103:6-10.

Field ME, Anthony RV, Engle TE, Archibeque SL, Keisler DH, Han H. 2015. Duration of maternal undernutrition differentially alters fetal growth and hormone concentrations. *Domest Anim Endocrinol*, 51:1-7.

Fleming TP, Velazquez MA, Eckert JJ, Lucas ES, Watkins AJ. 2012. Nutrition of females during the pen-conceptional period and effects on foetal programming and health of offspring. *Anim Reprod Sci*, 130:193-197.

Ford SP, Hess BW, Schwope MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H, Nathanielsz PW. 2007. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *J Anim Sci*, 85:1285-1294.

Ford SP, Zhang LR, Zhu MJ, Miller MM, Smith DT, Hess BW, Moss GE, Nathanielsz PW, Nijland MJ. 2009. Maternal obesity accelerates fetal pancreatic beta-cell but not alpha-cell development in sheep: prenatal consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297:R835-R843.

Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. 2008. The placenta and intrauterine programming. *J Neuroendocrinol*, 20:439-450.

Funston RN, Larson DM, Vonnahme KA. 2010. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: implications for beef cattle production. *J Anim Sci*, 88:E205-215.

Funston RN, Summers AF. 2013. Effect of prenatal programming on heifer development. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 29:517-536.

Gabory A, Attig L, Junien C. 2011. Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr*, 94:1943S-1952S.

Gardner DS, Pearce S, Dandrea J, Walker R, Ramsay MM, Stephenson T, Symonds ME. 2004. Peri-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evoked baroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension*, 43:1290-1296.

Gardner DS, Ozanne S, Sinclair AJ. 2009. Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals. *Phil Trans R Soc B*, 364:3419-3427.

George LA, Staniar WB, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ. 2009. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. *Domest Anim Endocrinol*, 37:23-29.

George LA, Uthlaut AB, Long NM, Zhang L, Ma Y, Smith DT, Nathanielsz PW, Ford SP. 2010. Different levels of overnutrition and weight gain during pregnancy have differential effects on fetal growth and organ development. *Reprod Biol Endocrinol*, 8:75.

Geraseev LC, Perez JRO, Carvalho PA, Oliveira RPd, Quintão FA, Lima AL. 2006. Efeitos das restrições pré e pós-natal sobre o crescimento e o desempenho de cordeiros Santa Inês do nascimento ao desmame. *Rev Bras Zootec*, 35:245-251.

Gluckman PD, Hanson MA, Bateson P, Beedle AS, Law CM, Bhutta ZA, Anokhin KV, BougnËres P, Chandak GR, Dasgupta P, Smith GD, Ellison PT, Forrester TE, Gilbert SF, Jablonka E, Kaplan H, Prentice AM, Simpson SJ, Uauy R, West-Eberhard MJ. 2009. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet*, 373:1654-1657.

Gnanalingham MG, Mostyn A, Symonds ME, Stephenson T. 2005. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep: potential role of glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289:R1407-R1415.

Gonzalez-Bulnes A, Ovilo C, Lopez-Bote CJ, Astiz S, Ayuso M, Perez-Solana ML, Sanchez-Sanchez R, Torres-Rovira L. 2012. Gender-specific early postnatal catch-up growth after intrauterine growth retardation by food restriction in swine with obesity/leptin resistance. *Reproduction*, 144:269-278.

Gonzalez-Recio O, Ugarte E, Bach A. 2012. Trans-generational effect of maternal lactation during pregnancy: a Holstein cow model. *Plos One*, 7:e51816.

Goodfellow LR, Earl S, Cooper C, Harvey NC. 2010. Maternal diet, behaviour and offspring skeletal health. *Int J Environ Res Public Health*, 7:1760-1772.

Greenwood PL, Hunt AS, Hermanson JW, Bell AW. 1998. Effects of birth weight and postnatal nutrition on

neonatal sheep. I. Body growth and composition, and some aspects of energetic efficiency. *J Anim Sci*, 76:2354-2367.

Greenwood PL, Hunt AS, Hermanson JW, Bell AW. 2000. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep. II. Skeletal muscle growth and development. *J Anim Sci*, 78:50-61.

Greenwood PL, Cafe LM. 2007. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: Longterm consequences for beef production. *Animal*, 1:1283-1296.

Guillemin N, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Jurie C, Micol D, Listrat A, Leveziel H, Renand G, Picard B. 2009. La maitrise de la tendreté de la viande bovine: identification de marqueurs biologiques. *INRA Prod Anim*, 22:331-344.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C,Winter PD. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, 303:1019-1022.

Hales CN, Barker DJ. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35:595-601.

Hales CN, Barker DJ. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*, 60:5-20.

Hancock SN, Oliver MH, McLean C, Jaquiery AL, Bloomfield FH. 2012. Size at birth and adult fat mass in twin sheep are determined in early gestation. *J Physiol (London)*, 590:1273-1285.

Hausman GJ, Dodson MV, Ajuwon K, Azain M, Barnes KM, Guan LL, Jiang Z, Poulos SP, Sainz RD, Smith S, Spurlock M, Novakofski J, Fernyhough ME, Bergen WG. 2009. The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci*, 87:1218-1246.

Hernandez CE, Matthews LR, Oliver MH, Bloomfield FH, Harding JE. 2010. Effects of sex, litter size and periconceptional ewe nutrition on offspring behavioural and physiological response to isolation. *Physiol Behav*, 101:588-594.

Hocquette JF, Gondret F, Baeza E, Medale F, Jurie C, Pethick DW. 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal*, 4:303-319.

Houdebine LM. 2003. Physiologie de la lactation. *In:* Cabrol D, Pons JC, Goffinet F. *Traité d'Obstétrique*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion. pp. 66-76.

Hovey R, Trott J, Vonderhaar B. 2002. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7:17-38.

Husted SM, Nielsen MO, Tygesen MP, Kiani A, Blache D, Ingvartsen KL. 2007. Programming of intermediate metabolism in young lambs affected by late gestational maternal undernourishment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293:548-557.

Jammes H, Junien C, Chavatte-Palmer P. 2011. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod Fertil Dev*, 23:64-74.

Kamal MM, Van Eetvelde M, Depreester E, Hostens M, Vandaele L, Opsomer G. 2014. Age at calving in heifers and level of milk production during gestation in cows are associated with the birth size of Holstein calves. *J Dairy Sci*, 97:5448-5458.

Kelly RW, Macleod I, Hynd P, Greeff JC. 1996. Nutrition during fetal life alters annual wool production and quality in young Merino sheep. *Aust J Exp Agric*, 36:259-267.

Kelly RW, Greeff JC, Macleod I. 2006. Lifetime changes in wool production of Merino sheep following differential feeding in fetal and early life. *Aust J Agric Res*, 57:867-876.

Kenyon PR, van der Linden DS, Blair HT, Morris ST, Jenkinson CMC, Peterson SW, Mackenzie DDS, Firth EC. 2011. Effects of dam size and nutritional plane during pregnancy on lamb performance to weaning. *Small Rumin Res*, 97:21-27.

Kenyon PR, Blair HT. 2014. Foetal programming in sheep: effects on production. *Small Rumin Res*, 118:16-30.

Khandaker GM, Dibben CRM, Jones PB. 2012. Does maternal body mass index during pregnancy influence risk of schizophrenia in the adult offspring? *Obes Rev*, 13:518-527.

Koch RM. 1972. The role of maternal effects in animal breeding. VI. Maternal effects in beef cattle. *J Anim Sci*, 35:1316-1323.

Kongsted AH, Husted SV, Thygesen MP, Christensen VG, Blache D, Tolver A, Larsen T, Quistorff B, Nielsen MO. 2013. Pre- and postnatal nutrition in sheep affects beta-cell secretion and hypothalamic control. *J Endocrinol*, 219:159-171.

Laguna-Barraza R, Bermejo-Alvarez P, Ramos-Ibeas P, de Frutos C, Lopez-Cardona AP, Calle A, Fernandez-Gonzalez R, Pericuesta E, Ramirez MA, Gutierrez-Adan A. 2012. Sex-specific embryonic origin of postnatal phenotypic variability. *Reprod Fertil Dev*, 25:38-47.

Lane M, Zander-Fox DL, Robker RL, McPherson NO. 2015. Peri-conception parental obesity, reproductive health, and transgenerational impacts. *Trends Endocrinol Metab*, 26:84-90.

Laporte-Broux B, Roussel-Huchette S, Ponter AA, Perault J, Chavatte-Palmer P, Duvaux-Ponter C. 2011. Short term effects of maternal feed restriction during pregnancy on goat kid morphology, metabolism and behavior. *J Anim Sci*, 89:2154-2163.

Laporte-Broux B, Roussel S, Ponter AA, Giger-Reverdin S, Camous S, Chavatte-Palmer P, Duvaux-Ponter C. 2012. Long-term consequences of feed restriction during late pregnancy in goats on feeding behavior and emotional reactivity of female offspring. *Physiol Behav*, 106:178-184.

Lie S, Morrison JL, Wyss O, Zhang S, Ozanne SE, McMillen IC. 2012. Periconceptional undernutrition

differentially alters insulin signalling in skeletal muscle in singleton and twin fetal sheep in late gestation. *Reprod Sci*, 19:263A-263A.

Lie S, Morrison JL, Williams-Wyss O, Ozanne SE, Zhang S, Walker SK, Kleemann DO, MacLaughlin SM, Roberts CT, McMillen IC. 2013. Impact of embryo number and periconceptional undernutrition on factors regulating adipogenesis, lipogenesis, and metabolism in adipose tissue in the sheep fetus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305:E931-E941.

Lie S, Morrison JL, Williams-Wyss O, Suter CM, Humphreys DT, Ozanne SE, Zhang S, Maclaughlin SM, Kleemann DO, Walker SK, Roberts CT,McMillen IC. 2014. Impact of embryo number and maternal undernutrition around the time of conception on insulin signaling and gluconeogenic factors and microRNAs in the liver of fetal sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306:E1013-1024.

Long NM, Prado-Cooper MJ, Krehbiel CR, DeSilva U, Wettemann RP. 2010. Effects of nutrient restriction of bovine dams during early gestation on postnatal growth, carcass and organ characteristics, and gene expression in adipose tissue and muscle. *J Anim Sci*, 88:3251-3261.

Long NM, Tousley CB, Underwood KR, Paisley SI, Means WJ, Hess BW, Du M, Ford SP. 2012. Effects of early- to mid-gestational undernutrition with or without protein supplementation on offspring growth, carcass characteristics, and adipocyte size in beef cattle. *J Anim Sci*, 90:197-206.

Lopez-Bote CJ. 1998. Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Sci*, 49(S1):S17-27.

MacLaughlin SM, Walker SK, Roberts CT, Kleemann DO, McMillen IC. 2005. Periconceptional nutrition and the relationship between maternal body weight changes in the periconceptional period and feto-placental growth in the sheep. *J Physiol*, 565.

MacLaughlin SM, Walker SK, Kleemann DO, Tosh DN, McMillen IC. 2010. Periconceptional undernutrition and being a twin each alter kidney development in the sheep fetus during early gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298:R692-R699.

Martin JL, Vonnahme KA, Adams DC, Lardy GP, Funston RN. 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J Anim Sci*, 85:841-847.

Martín NP, Kenyon PR, Morel PCH, Pain SJ, Jenkinson CMC, Hutton PG, Morris ST, Peterson SW, Firth EC, Blair HT. 2012. Ewe nutrition in early and mid- to late pregnancy has few effects on fetal development. *Anim Prod Sci*, 52:533-539.

Matthiesen CF, Blache D, Thomsen PD, Tauson AH. 2010. Feeding mink (*Neovison vison*) a protein-restricted diet during pregnancy induces higher birth weight and altered hepatic gene expression in the F(2) offspring. *Br J Nutr*, 104:544-553.

McCance RA. 1976. Critical periods of growth. *Proc Nutr Soc*, 35:309-313.

McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. 2008. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102:82-89.

Micke GC, Sullivan TM, Gatford KL, Owens JA, Perry VEA. 2010. Nutrient intake in the bovine during early and mid-gestation causes sex-specific changes in progeny plasma IGF-I, liveweight, height and carcass traits. *Anim Reprod Sci*, 121:208-217.

Micke GC, Sullivan TM, McMillen IC, Gentili S, Perry VEA. 2011. Protein intake during gestation affects postnatal bovine skeletal muscle growth and relative expression of IGF1, IGF1R, IGF2 and IGF2R. *Mol Cell Endocrinol*, 332:234-241.

Morise A, Seve B, Mace K, Magliola C, Le Huerou-Luron I, Louveau I. 2011. Growth, body composition and hormonal status of growing pigs exhibiting a normal or small weight at birth and exposed to a neonatal diet enriched in proteins. *Br J Nutr*, 105:1471-1479.

Mostyn A, Symonds ME. 2009. Early programming of adipose tissue function: a large-animal perspective. *Proc Nutr Soc*, 68:393-400.

Mostyn A, Attig L, Larcher T, Dou S, Chavatte-Palmer P, Boukthir M, Gertler A, Djiane J, M ES, Abdennebi-Najar L. 2014. UCP1 is present in porcine adipose tissue and is responsive to postnatal leptin. *J Endocrinol*, 223:M31-M38.

Munoz G, Ovilo C, Silio L, Tomas A, Noguera JL, Rodriguez MC. 2009. Single- and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm quantitative trait loci on Sus scrofa chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits. *J Anim Sci*, 87:459-468.

Nissen PM, Danielsen VO, Jorgensen PF, Oksbjerg N. 2003. Increased maternal nutrition of sows has no beneficial effects on muscle fiber number or postnatal growth and has no impact on the meat quality of the offspring. *J Anim Sci*, 81:3018-3027.

Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M. 2004. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domest Anim Endocrinol*, 27:219-240.

Oliver MH, Jaquiery AL, Kenyon PR, Pain SJ, Jenkinson CM, Blair HT, Derraik JGB, Bloomfield FH. 2015. Maternal insulin sensitivity in midpregnancy does not determine birth weight after embryo transfer between large and small breed sheep. *Domest Anim Endocrinol*, 50:50-54.

Otten W, Kanitz E, Tuchscherer M, Gräbner M, Nürnberg G, Bellmann O, Hennig U, Rehfeldt C, Metges CC. 2013. Effects of low and high protein:carbohydrate ratios in the diet of pregnant gilts on maternal cortisol concentrations and the adrenocortical and sympathoadrenal reactivity in their

offspring. *J Anim Sci*, 91:2680-2692.
Ousey JC. 1997. Thermoregulation and the energy requirement of the newborn foal with reference to prematurity. *Equine Vet*, 29(S24):104-108.
Ousey JC, Fowden AL, Wilsher S, Allen WR. 2008. The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. *Equine Vet J*, 40:673-679.
Ovilo C, Fernandez A, Noguera JL, Barragan C, Leton R, Rodriguez C, Mercade A, Alves E, Folch JM, Varona L, Toro M. 2005. Fine mapping of porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross. *Genet Res*, 85:57-67.
Pala A, McCraw R. 2005. Replacement heifer selection in a beef cattle herd. *Am J Appl Sci*, 2:542-544.
Paten AM, Kenyon PR, Lopez-Villalobos N, Peterson SW, Jenkinson CMC, Pain SJ, Blair HT. 2013. Lactation Biology Symposium: maternal nutrition during early and mid-to-late pregnancy: comparative effects on milk production of twin-born ewe progeny during their first lactation. *J Anim Sci*, 91:676-684.
Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, Dahirel M, Dubois C, Jouneau A, Reigner F, Berthelot V, Chaffaux S, Tarrade A, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. 2014. Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. *Plos One*, 9:e102044.
Peugnet P, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, Guillaume D, Camous S, Berthelot V, Toquet M-P, Richard E, Sandersen C, Chaffaux S, Lejeune J-P, Tarrade A, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. 2015a. Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre-weaning horses. *Plos One*, 10:e0122596.
Peugnet P, Wimel L, Tarrade A, Robles M, Dubois C, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. 2015b. La santé du futur poulain se prépare dès la gestation. *In*: 41ème Journée de la Recherche Equine, Paris, France. Le Pin au Haras: Institut Français du Cheval et de l'Equitation/INRA. pp. 84-92.
Picard B, Lefaucheur L, Berri C, Duclos MJ. 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod Nutr Dev*, 42:415-431.
Powell SE, Aberle ED. 1980. Effects of birth weight on growth and carcass composition of swine. *J Anim Sci*, 50:860-868.
Rehfeldt C, Kuhn G. 2006. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *J Anim Sci*, 84:E113-E123.
Rehfeldt C, Lang IS, Görs S, Hennig U, Kalbe C, Stabenow B, Brüssow KP, Pfuhl R, Bellmann O, Nürnberg G, Otten W, Metges CC. 2011. Limited and excess dietary protein during gestation affects growth and compositional traits in gilts and impairs offspring fetal growth. *J Anim Sci*, 89:329-341.
Rehfeldt C, Stabenow B, Pfuhl R, Block J, Nürnberg G, Otten W, Metges CC, Kalbe C. 2012. Effects of limited and excess protein intakes of pregnant gilts on carcass quality and cellular properties of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in fattening pigs. *J Anim Sci*, 90:184-196.
Rossdale PD, Ousey JC.2003. Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. *Equine Vet Educ*, 15(S6):24-37..
Rumball CW, Bloomfield FH, Harding JE. 2008. Cardiovascular adaptations to pregnancy in sheep and effects of periconceptional undernutrition. *Placenta*, 29:89-94.
Satterfield MC, Coverdale JA, Wu GY. 2010. Review of fetal programming: implications to horse health. *In*: Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 2010, Baltimore, MD. Baltimore: AAEP. pp. 207-214.
Schinckel P, Short B. 1961. Influence of nutritional level during pre-natal and early post-natal life on adult fleece and body characters. *Aust J Agric Res*, 12:176-202.
Sejian V, Maurya VP, Naqvi SMK. 2011. Effect of thermal stress, restricted feeding and combined stresses (thermal stress and restricted feeding) on growth and plasma reproductive hormone levels of Malpura ewes under semi-arid tropical environment. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 95:252-258.
Sibbald AM, Davidson GC. 1998. The effect of nutrition during early life on voluntary food intake by lambs between weaning and 2 years of age. *Anim Sci*, 66:697-703.
Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, Thurston A, Huntley JF, Rees WD, Maloney CA, Lea RG, Craigon J, McEvoy TG, Young LE. 2007. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Nat Acad Sci USA*, 104:19351-19356.
Steegers-Theunissen RP, Twigt J, Pestinger V, Sinclair KD. 2013. The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: the importance of one-carbon metabolism. *Hum Reprod Update*, 19:640-655.
Stickland NC. 1978. A quantitative study of muscle development in the bovine foetus (*Bos indicus*). *Anat Histol Embryol*, 7:193-205.
Swali A, Wathes DC. 2006. Influence of the dam and sire on size at birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers. *Theriogenology*, 66:1173-1184.
Symonds ME, Lomax MA. 1992. Maternal and environmental influences on thermoregulation in the neonate. *Proc Nutr Soc*, 51:165-172.
Symonds ME, Sebert SP, Budge H. 2010. Nutritional regulation of fetal growth and implications for

productive life in ruminants. *Animal*, 4:1075-1083.

Symonds ME, Pope M, Sharkey D, Budge H. 2012. Adipose tissue and fetal programming. *Diabetologia*, 55:1597-1606.

Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A. 2015. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J Exp Biol*, 218:50-58.

Tischner M. 2000. Maternal influence on pre- and postnatal growth of foals born after embryo transfer. *J Reprod Fertil Suppl*, 56:705-708.

Tong JF, Zhu MJ, Underwood KR, Hess BW, Ford SP, Du M. 2008. AMP-activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells. *J Anim Sci*, 86:1296-1305.

Tong JF, Yan X, Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. 2009. Maternal obesity downregulates myogenesis and β-catenin signaling in fetal skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296:E917-E924.

Torrens C, Snelling TH, Chau R, Shanmuganathan M, Cleal JK, Poore KR, Noakes DE, Poston L, Hanson MA, Green LR. 2009. Effects of pre- and periconceptional undernutrition on arterial function in adult female sheep are vascular bed dependent. *Exp Physiol*, 94:1024-1033.

Underwood KR, Tong JF, Price PL, Roberts AJ, Grings EE, Hess BW, Means WJ, Du M. 2010. Nutrition during mid to late gestation affects growth, adipose tissue deposition, and tenderness in cross-bred beef steers. *Meat Sci*, 86:588-593.

Van der Heyden L, Lejeune JP, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, Chavatte P, Paris J, Deliege B, Serteyn D. 2013. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Vet Rec*, 172:68.

van der Linden DS, Kenyon PR, Blair HT, Lopez-Villalobos N, Jenkinson CM, Peterson SW, Mackenzie DD. 2009. Effects of ewe size and nutrition on fetal mammary gland development and lactational performance of offspring at their first lactation. *J Anim Sci*, 87:3944-3954.

van Montfoort AP, Hanssen LL, de Sutter P, Viville S, Geraedts JP, de Boer P. 2012. Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance. *Hum Reprod Update*, 18:171-197.

Vonnahme KA, Hess BW, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. 2006. Placentomal differentiation may compensate for maternal nutrient restriction in ewes adapted to harsh range conditions. *J Anim Sci*, 84:3451-3459.

Wallace JM, Bourke DA, Aitken RP, Milne JS, Hay WW. 2003. Placental glucose transport in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *J Physiol (London)*, 547:85-94.

Wallace JM, Milne JS, Aitken RP. 2005. The effect of overnourishing singleton-bearing adult ewes on nutrient partitioning to the gravid uterus. *Br J Nutr*, 94:533-539.

Walton A, Hammond J. 1938. The maternal effects on growth and conformation in shire horse-shetland pony crosses. *Proc R Soc Lond B*, 125:311-335.

Watkins AJ, Papenbrock T, Fleming TP. 2008. The preimplantation embryo: handle with care. *Semin Reprod Med*, 26:175-185.

Watkins AJ, Lucas ES, Fleming T. 2010. Impact of the periconceptional environment on the programming of adult disease. *J Dev Origins Health Dis*, 1:1-9.

Whorwood CB, Firth KM, Budge H, Symonds ME. 2001. Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin ii receptor in neonatal sheep. *Endocrinology*, 142:2854-2864

Williams-Wyss O, Zhang S, MacLaughlin SM, Kleemann D, Walker SK, Suter CM, Cropley JE, Morrison JL, Roberts CT, McMillen IC. 2014, Embryo number and periconceptional undernutrition in the sheep have differential effects on adrenal epigenotype, growth, and development. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 307:E141-E150.

Wilsher S, Allen WR. 2006. Effects of a *Streptococcus equi* infection--mediated nutritional insult during mid-gestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. *Equine Vet J*, 38:549-557.

Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*, 134:2169-2172.

Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. 2006. Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J Anim Sci*, 84:2316-2337.

Zhang L, Long NM, Hein SM, Ma Y, Nathanielsz PW, Ford SP. 2011a. Maternal obesity in ewes results in reduced fetal pancreatic beta-cell numbers in late gestation and decreased circulating insulin concentration at term. *Domest Anim Endocrinol*, 40:30-39.

Zhang S, Rattanatray L, McMillen IC, Suter CM, Morrison JL. 2011b. Periconceptional nutrition and the early programming of a life of obesity or adversity. *Prog Biophys Mol Biol*, 106:307-314.

Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanatray L, MacLaughlin SM, Kleemann D, Walker SK, McMillen IC. 2013a. Dietary restriction in the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in increased abundance of angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin type 1 receptor (AT1R) in the absence of changes in ACE or AT1R methylation in the adrenal of the offspring. *Reproduction*, 146:443-454.

Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanatray L, MacLaughlin SM, Kleemann D, Walker SK, McMillen IC. 2013b. Maternal dietary restriction during the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and down-regulation of the

IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. *Endocrinology*, 154:4650-4662.

Zhu MJ, Ford SP, Means WJ, Hess BW, Nathanielsz PW, Du M. 2006. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J Physiol (London)*, 575:241-250.

Zhu MJ, Du M, Hess BW, Nathanielsz PW, Ford SP. 2007. Periconceptional nutrient restriction in the ewe alters MAPK/ERK1/2 and PI3K/Akt growth signaling pathways and vascularity in the placentome. *Placenta*, 28:1192-1199.

Zhu MJ, Du M, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Hess BW, Moss GE, Ford SP. 2009. Down-regulation of growth signaling pathways linked to a reduced cotyledonary vascularity in placentomes of over-nourished, obese pregnant ewes. *Placenta*, 30:405-410.

View publication stats

Vulgarisation

Vulgarisation 1 : L'alimentation de la jument en gestation et du poulain en croissance est primordiale pour le bon développement du poulain et sa future carrière sportive et peut-être reproductive : bilan du projet Foetalim 2

Morgane Robles, Camille Gautier, Pauline Peugnet, Luis Mendoza, Cédric Dubois, Jean-Philippe Lejeune, Laurence Wimel, Didier Serteyn, Hélène Bouraïma-Lelong, Pascale Chavatte-Palmer

43èmes Journées de la Recherche Equine
16/03/2017, Paris

43ème Journée de la Recherche Équine
Jeudi 16 mars 2017

L'alimentation de la jument en gestation et du poulain en croissance est primordiale pour le bon développement du poulain et sa future carrière sportive et peut-être reproductive : bilan du projet Foetalim 2

M. Robles[1], C. Gautier[2], P. Peugnet[1], L. Mendoza[3], C. Dubois[4], JP. Lejeune[3], L. Wimel[4], D. Serteyn[3], H. Bouraïma-Lelong[2], P. Chavatte-Palmer[1]

[1] INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, Batiment 230, 78350, Jouy-en-Josas, France
[2] Normandie Univ, UNICAEN, EA2608, OeReCa, USC-INRA 1377, Bâtiment M, Campus 1, Université de Basse-Normandie, Esplanade de la paix, CS 14032, 14032 Caen cedex, France
[3] Centre Européen du Cheval, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Mont le soie,1, 6698, Vielsalm, Belgique
[4] Station expérimentale des Haras, Domaine de la Valade, Route de la Valade, 19370, Chamberet, France

Résumé

Le rôle de l'environnement maternel pour le développement du phénotype adulte est bien connu chez l'homme et les animaux modèles. Dans l'espèce équine, la sous-nutrition modérée de la jument gestante n'entraine pas d'effet sur le poids de naissance du poulain car le placenta semble compenser cette sous-nutrition. Cependant, on observe un retard de maturation testiculaire à 12 mois et de développement osseux à partir de 19 mois. De plus, une surnutrition des poulains entre 20 et 24 mois altère l'intégralité de leur système de régulation du métabolisme glucidique, pouvant entrainer par la suite des effets négatifs sur leurs performances sportives. D'autre part, la supplémentation des juments avec des céréales en fin de gestation augmente le risque pour le poulain de développer des lésions d'ostéochondrose. Ces effets pourraient peut-être être réduits par une alimentation fractionnée des poulains dans la journée (utilisation d'un distributeur automatique). Une alimentation de qualité chez la jument gestante et son poulain en croissance est donc essentielle pour optimiser les chances de performances sportives et reproductives à l'âge adulte.

Mots clés : Nutrition, céréales, testicule, croissance, métabolisme

Summary

Human and animal model studies have shown that the adult phenotype of an individual can be modulated by maternal environment. In horses, moderate maternal undernutrition in late gestation does not affect the foal's birth weight as the placenta appears to compensate for maternal restriction but alters the metabolism of the growing foal and results in delayed testicular maturation at 12 months of age and bone development from 19 months of age. Moreover, excess nutrition of these foals between 20 and 24 months of age largely modifies the regulation of their carbohydrate metabolism, which can subsequently lead to decreased athletic performances. On the other hand, feeding mares with cereals in late gestation increases the risk for the foal to develop osteochondrosis. These effects could possibly be reduced by feeding meals throughout the day, for instance through the use of an automatic feeder. Thus, the quality of the nutrition of both mares and foals is essential to optimize chances of athletic and reproductive performance in adulthood.

Key-words: Nutrition, cereals, testicle, growth, metabolism

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

Introduction

Au cours de la domestication, le recours à la sélection génétique a permis une très forte amélioration des performances des animaux. La sélection s'appuie sur le recueil des performances et l'indexation génétique permettant de choisir les meilleurs reproducteurs. Des conditions d'élevage optimales permettent aux animaux d'exprimer au mieux leur potentiel génétique. Cependant des données scientifiques récentes montrent que l'amélioration de la santé et des performances des animaux pourrait aussi passer par des effets de l'environnement maternel durant la gestation. Cela s'applique aussi au cheval…

Il est important de prendre en compte la génétique de la jument et de l'étalon lorsque l'on souhaite produire un poulain. Mais la génétique ne fait pas tout. En effet, il est possible de modifier la manière dont l'information génétique est lue et interprétée. Par exemple le clone d'un animal donné ne présentera pas les mêmes marques sur son pelage malgré un même patrimoine génétique car il n'a pas été porté par la même mère. Ainsi son information génétique n'a pas été interprétée de la même manière.

Ce phénomène est impliqué dans les Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD) qui relient les évènements de la vie précoce (de la conception à la puberté) avec le risque, chez l'humain, de développer des maladies comme le diabète, l'obésité ou des maladies cardio-vasculaires à l'âge adulte. Ainsi, l'environnement au sens large (nutrition, exposition à des produits chimiques, stress psychologique) auquel l'individu sera confronté va modifier la manière dont son information génétique est interprétée par son organisme (on parle de modifications épigénétiques). Chez l'humain, les mécanismes de la DOHaD sont maintenant pris en compte dans la lutte contre l'épidémie d'obésité : la nutrition de la mère et de l'enfant a une place primordiale parmi les objectifs mondiaux de l'OMS pour l'horizon 2025.

Le cheval peut également développer des maladies métaboliques à l'âge adulte telles que le syndrome métabolique, l'obésité, la résistance à l'insuline, le syndrome de Cushing, la fourbure et l'ostéochondrose. La surnutrition et la sédentarité sont deux facteurs à l'origine de ces pathologies et l'obésité est devenue un véritable problème de santé publique au sein de la filière équine.

Nous avons montré dans une première étude (Foetalim 1) que le choix de la receveuse lors de transfert d'embryon pouvait conditionner la croissance, le métabolisme et les lésions d'ostéochondrose chez le poulain. **L'objectif de la deuxième partie du projet Foetalim 2 était de comprendre comment la nutrition de la jument gestante et du poulain en croissance vont programmer la santé du poulain à l'âge adulte et donc ses futures carrières sportive et reproductive. Après une présentation des données de la littérature, nous présentons les résultats obtenus dans cette deuxième étude.**

1. Pourquoi bien nourrir la jument gestante et le poulain en croissance – revue de la littérature

Chez le cheval, c'est surtout l'effet d'une sous-nutrition modérée et d'une surnutrition à base de céréales qui ont été étudiés.

1.1 Ne pas assez nourrir sa jument en gestation

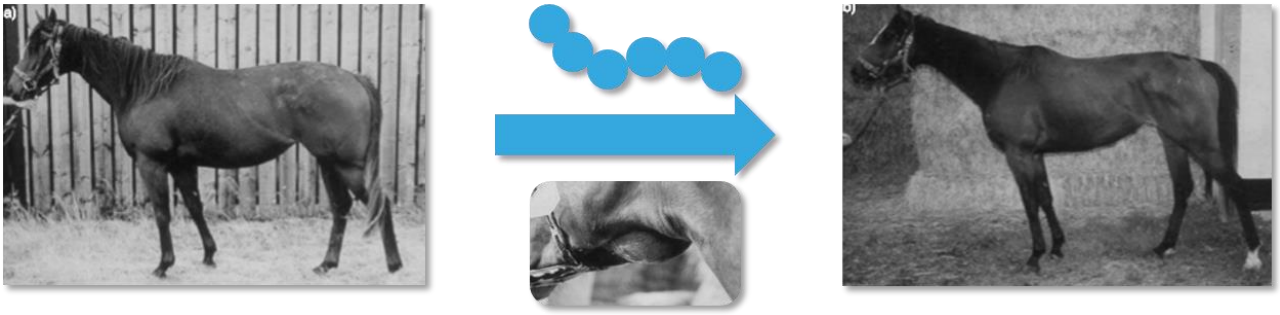
Des juments Pur-sang anglais qui ont accidentellement été atteintes par la gourme (*Streptococcus equi*) en cours de gestation (autour du 3ème mois de gestation, pour une durée de 3 semaines) ont cessé de s'alimenter pendant cette période et ont donc perdu beaucoup d'état corporel et de poids (environ 40 kg) (Wilsher and Allen, 2006). La perte de poids de ces juments est illustrée en figure I.

Les placentas des juments atteintes par la gourme étaient moins étendus, et moins efficaces. Cela signifie qu'ils ont produit moins de kg de poulain par kg de placenta. Cependant, les zones impliquées dans les échanges entre la mère et le fœtus étaient augmentées chez ces juments. Les poulains des juments malades sont nés plus légers de 3 kg et également plus courts que les poulains des juments saines à la naissance.

Dans cet exemple, la perte de poids a été très importante : il y a donc eu une sous-nutrition sévère. Le placenta, organe à l'interface entre la mère et le fœtus, n'a pas été capable de s'adapter suffisamment, malgré l'augmentation des zones d'échange. Les placentas des juments ont donc été moins efficaces et ont produit des poulains plus légers et moins longs.

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

Figure I : Perte de poids des juments autour du 3ème mois de gestation due à une infection à *streptococcus equi* (gourme). Les juments présentaient des abcès au niveau de l'auge et ont cessé de s'alimenter (photographie issue de l'article (Wilsher and Allen, 2006)).
Figure I : Broodmares weight loss during the 3rd month of gestation after streptococcus equi infection. The mares had abscess in the sub-mandibular area and have stopped eating (Photography from the article (Wilsher and Allen, 2006)).



1.2. Nourrir les juments en gestation avec des céréales

La sur-nutrition de la poulinière au cours de la gestation ne modifie pas les mensurations du placenta (poids, volume, surface), le poids de naissance des poulains ni leur croissance (George et al., 2009; Thorson et al., 2010). Cependant, il a été montré que les poulains nés de juments sur-nourries avec des concentrés avaient des altérations de la régulation du stockage du glucose jusqu'à 16 jours (George et al., 2009). Ces poulains sont hyperglycémiques, produisent moins d'insuline et sont moins bien capables de stocker le glucose dans leurs muscles. Ces modifications peuvent conduire à des maladies métaboliques à l'âge adulte. De plus, il a aussi été montré que la sur-nutrition de la poulinière entrainait des modifications du système de régulation de l'appétit chez les poulains âgés de 18h (Cavinder et al., 2012). En effet, la concentration circulante de leptine, hormone impliquée dans le sentiment de satiété, était diminuée chez les poulains nés de juments sur-nourries. Les poulains pourraient donc ne pas pouvoir réguler leur prise alimentaire et devenir obèses avec le temps.

Une étude épidémiologique réalisée en Wallonie a montré que les juments qui ingéraient des céréales au cours de la gestation (avec ou sans fourrages, tous types de céréales) avaient plus de risques de produire des poulains atteints d'ostéochondrose (Heyden et al., 2013).

1.3 Sur-nourrir le poulain en croissance

L'ostéochondrose est une maladie pour laquelle le cartilage de croissance au niveau de l'articulation mature mal en os, ce qui peut conduire à la libération de fragments dans l'articulation (Ytrehus et al., 2007). L'ostéochondrose se met en place jusqu'à 1 an et demi chez le poulain. C'est-à-dire qu'un poulain peut être affecté à 6 mois, mais être sain à 1 an et demi et vice versa. Si le poulain est affecté à 1 an et demi, il le restera toute sa vie. Les facteurs de développement de l'ostéochondrose sont nombreux. Parmi eux, on retrouve la génétique, le manque d'exercice, une alimentation déséquilibrée en minéraux mais également des rations non équilibrées en énergie.

Il a été montré qu'une alimentation trop riche en sucres rapides (gros repas de concentrés) augmentait la concentration en insuline (insulinémie) dans le sang du poulain de manière très importante. Cette augmentation est liée à un risque plus important de développer des lésions d'ostéochondrose chez les poulains âgés de moins d'1 an et demi (Ralston, 1996). De plus, une croissance trop rapide des poulains (qui ont donc été sur-nourris par rapport à leurs besoins) augmente le risque de développement d'ostéochondrose (Donabédian et al., 2006).

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

2. Le projet FOETALIM 2

2.1 Présentation et objectif de l'étude

Les études présentées ci-dessus indiquent que la supplémentation des juments gestantes avec des céréales, riches en sucres solubles, peut altérer le métabolisme et la régulation de la satiété et augmenter le développement de lésions d'ostéochondrose chez leurs poulains. De plus, l'apport excessif de céréales (surtout des gros repas) au poulain conduit à une croissance trop rapide et induit un risque accru de développer des lésions d'ostéochondrose.

Le but de notre étude était d'étudier l'effet de la distribution de céréales aux juments en fin de gestation sur la croissance, le métabolisme et le statut ostéoarticulaire des poulains sur-nourris entre 20 et 24 mois et sur la maturité testiculaire des poulains prépubères.

2.2 Matériels et méthodes

Le plan expérimental est présenté en figure II.

Vingt-quatre juments de race Anglo-Arabe ont été conduites en pâture dans les mêmes prés depuis l'insémination jusqu'au 7ème mois de gestation. A partir du 7ème mois de gestation elles ont été rentrées au box et séparées en deux lots :

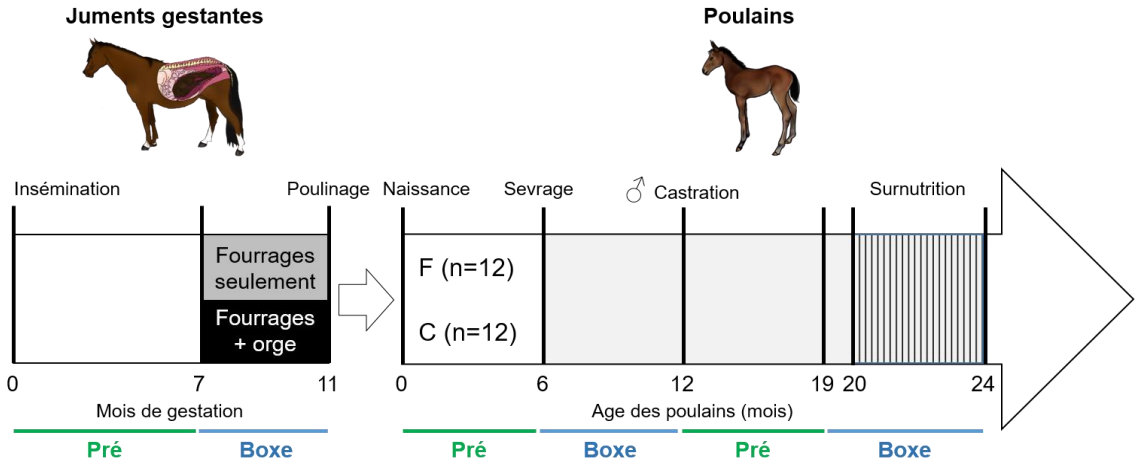
- Le groupe « Fourrage » (F, n=12). Ces juments ont été nourries avec des fourrages uniquement (foin et foin enrubanné) jusqu'au poulinage.
- Le groupe « Céréales » (C, n=12). Ces juments ont été nourries avec des céréales (orge aplatie, de 2 à 3 kg de concentré par jour) et des fourrages (foin et foin enrubanné) jusqu'au poulinage.

Trois jours après le poulinage, les juments suitées de leurs poulains sont retournées en pâture dans les mêmes prés jusqu'au sevrage des poulains à 6 mois.

- Durant toute la gestation, l'état corporel des juments a été mesuré chaque mois *via* la note d'état. Le métabolisme des juments a été suivi grâce à des tests de tolérance au glucose (TCTG) au 3ème mois de gestation et au 9ème mois de gestation. Au 7ème mois de gestation, un suivi de la concentration en glucose (glycémie) et en insuline (insulinémie) avant et après les repas a été réalisé.
- Au poulinage, les placentas ont été pesés et mesurés et des échantillons ont été prélevés pour étudier leur structure et leur fonction.
- Entre 20 et 24 mois, tous les poulains ont été sur-nourris (+140% des recommandations, 6kg de concentré/jour) à l'aide d'un distributeur automatique de concentrés.
- La croissance des poulains (poids, hauteur au garrot et largeur des canons) a été suivie jusqu'à leurs 2 ans. Leur métabolisme glucidique a été étudié à 3 jours, 6 mois, 19 mois et 24 mois grâce à deux tests différents de tolérance au glucose (TCTG et FSIVGTT). Des radiographies ont été réalisées à 6 mois et 24 mois afin de réaliser un bilan de leur santé ostéo-articulaire. Les poulains ont été castrés à 12 mois, la fonction et la structure des testicules ont été analysées afin de déterminer l'avancée de leur maturation testiculaire.

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

Figure II. Plan expérimental présentant le logement, les périodes de régimes expérimentaux ainsi que les manipulations réalisées sur les poulains depuis l'insémination des juments jusqu'aux 2 ans des poulains.
Figure II. Housing, periods of experimental diets and manipulations carried out on foals and mares from insemination of mares until 2 years of age of foals.



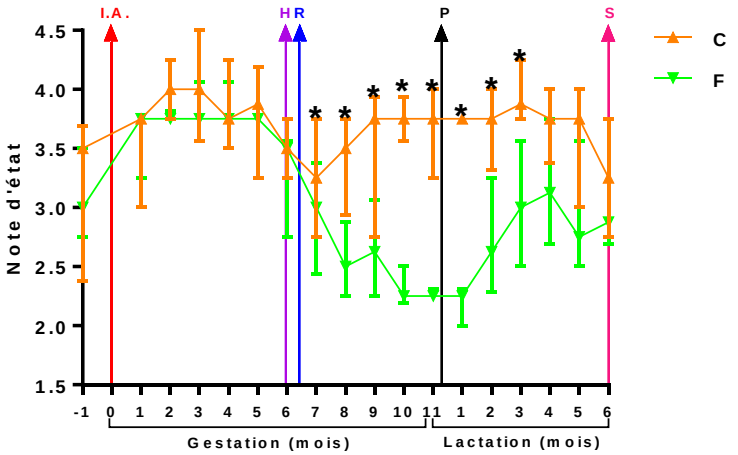
2.3 Résultats

2.3.1 Juments gestantes

Apports nutritionnels : Les juments du lot C ont ingéré plus d'énergie, plus de protéines et moins de fibres que les juments du lot F entre le 7ème mois et le 10ème mois de gestation. Au dernier mois de gestation, les juments des deux lots ont reçu la même quantité d'énergie et de protéines, les juments du lot F recevant toujours plus de fibres que les juments du lot C.

Note d'état : Durant la gestation, les juments du lot C ont maintenu un état corporel optimal (note d'état supérieure à 3/5) alors que les juments du lot F ont perdu de l'état en fin de gestation jusqu'à atteindre une note d'état de 2,25/5 au poulinage et ont mis plus de 3 mois au pâturage (prairies de printemps) pour rattraper l'état corporel des juments C. La courbe d'évolution de l'état corporel des juments est présentée en figure III.

Figure III. Evolution de la note d'état des juments au cours de la gestation.
Figure III. Evolution of the body condition of the mares during gestation.



A l'insémination (I.A.), les juments des deux lots avaient la même note d'état. Les juments du lot C ont maintenu un état corporel stable et optimal tout au long de la gestation. Les juments du lot F ont perdu de l'état à partir du 6ème mois de gestation (H, hivernage, R, début du régime, différence statistique

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

significative matérialisée par des étoiles) jusqu'au poulinage (P). Au pré, elles ont mis 3 mois pour rattraper l'état corporel des juments C et étaient encore légèrement moins grasses au sevrage des poulains (S).

At insemination (IA.), broodmares from both groups had the same body condition score. C mares maintained a stable and optimal body condition during the whole gestation. F mares lost body condition from the 6th month of gestation (H, wintering, R, beginning of the experimental diet, stars indicate significant statistical difference) until foaling (P). In pasture, F mares took 3 months to catch up the body condition of C mares and were lightly less fat for the foals weaning (S).

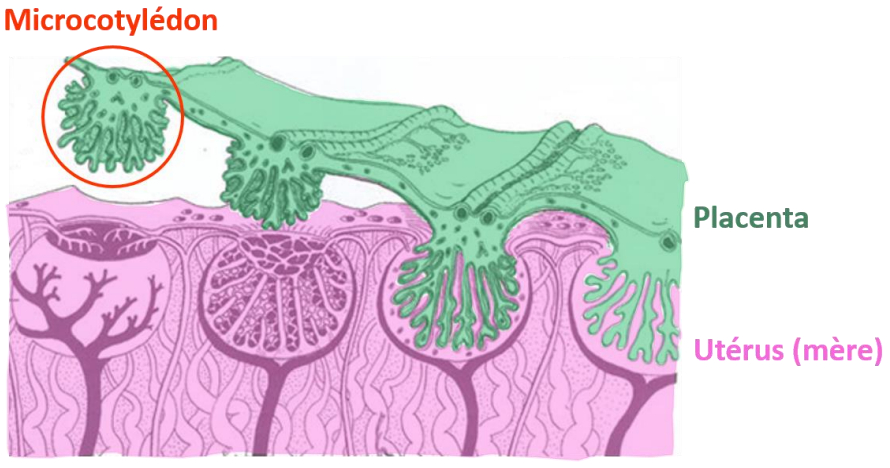
Métabolisme : En fin de gestation (à 9 mois de gestation), les juments du lot C étaient moins sensibles à l'insuline que les juments du lot F. Chez les juments C, le repas était suivi d'une augmentation de la glycémie et de l'insulinémie qui n'étaient pas observées chez les juments nourries uniquement aux fourrages. De plus, les juments du lot F avaient une concentration en acides gras non estérifiés (AGNE) plus importante durant la gestation. Les AGNE sont mesurés pour mesurer la lipomobilisation, c'est-à-dire l'utilisation des lipides stockés pour obtenir l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme dans le cas d'une sous-nutrition.

En conclusion, la supplémentation en céréales a permis aux juments de maintenir un état corporel stable et optimal tout au long de la gestation mais a diminué leur sensibilité à l'insuline en fin de gestation. Les fourrages donnés aux juments n'étaient pas de qualité suffisante et/ou distribués en quantité suffisante aux juments du lot « Fourrages » qui étaient donc modérément sous-nourries (Peugnet et al., 2015a, 2015b)**.**

2.3.2 Poulains et placentas à la naissance

A la naissance, les poulains des deux lots pesaient le même poids et mesuraient la même taille. Les placentas pesaient le même poids, avaient la même surface et le même volume. L'efficacité placentaire (poids du poulain (kg)/ poids du placenta (kg)) n'était également pas différente entre les lots. Chez le cheval, les échanges de nutriments entre le sang de la mère et celui du poulain se réalisent dans des structures particulières appelées « microcotylédons » (figure IV). Les placentas des juments F avaient des vaisseaux des microcotylédons plus volumineux que les juments C, ce qui indique une adaptation placentaire permettant d'augmenter les échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus.

Figure IV. Chez le cheval, les microcotylédons sont les structures du placenta où se déroulent les échanges de nutriments entre la mère et le fœtus (image issue de l'article (Steven and Samuel, 1975)).
Figure IV. In the horse, microcotyledons are the placental structure where the exchanges of nutrient between the dam and the foetus occur (picture from the article (Steven and Samuel, 1975)).



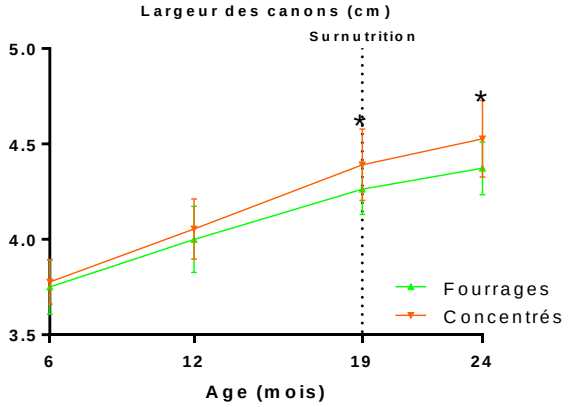
Le placenta s'est adapté à la sous-nutrition : le volume des vaisseaux a été augmenté pour compenser le manque de nutriments reçus par les juments afin d'augmenter le flux sanguin et donc l'apport en nutriments au fœtus. Ce qui explique pourquoi les poulains du lot F sont nés avec le même poids que les poulains du lot C.

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

2.3.3 Poulains

Croissance : Les poulains des lots C et F ont eu la même croissance (hauteur au garrot et poids) jusqu'à 24 mois. Cependant, les poulains du lot F avaient des canons moins larges que les poulains du lot C à partir de 19 mois (Figure V). **La sous-nutrition des juments en fin de gestation a donc modifié la croissance des os des poulains.** Cependant, nous ne savons pas s'il y avait une différence dans la densité des os entre les poulains des deux lots.

Figure V. Les poulains du lot « Fourrages » avaient des canons moins larges que les poulains du lot « Concentrés » à partir de 19 mois d'âge (différence statistiquement significative matérialisée par les étoiles).
Figure V. Foals from F group had less wide cannon bones than C foals from 19 months of age (stars indicate significant statistical difference).



Maturation testiculaire : **A 1 an, les poulains mâles du lot F avaient des testicules moins matures que les poulains du lot C**. La nutrition de la jument a eu un impact sur le développement des testicules des poulains, ce qui pourrait indiquer un retard à la puberté. L'effet éventuel sur les performances de reproduction reste à démontrer.

Métabolisme : A 3 jours et à 19 mois, les poulains du lot F étaient moins sensibles à l'insuline que les poulains du lot C. **La sous-nutrition des juments en fin de gestation a donc modifié la régulation du stockage du glucose chez les poulains, pouvant conduire par la suite à des problèmes métaboliques.**

Surnutrition : La surnutrition entre 20 et 24 mois a permis d'obtenir un gain moyen quotidien (moyenne 550g/j sur les 4 mois de surnutrition). L'adiposité (accumulation de gras) des poulains des deux lots a été augmentée et la régulation du glucose a aussi été perturbée dans les deux lots. Cependant, le métabolisme a été plus affecté (résistance à l'insuline en particulier) chez les poulains du lot C par rapport à ceux du lot F (qui étaient déjà résistants à l'insuline au début de la surnutrition).

Ostéochondrose : A 6 mois, les lésions d'ostéochondrose étaient plus nombreuses chez les poulains du lot C par rapport au lot F. Cette différence avait disparu à 24 mois. Ainsi, comme ce qui avait été observé dans l'étude épidémiologique Wallonne présentée en partie 1, **les juments qui avaient été nourries avec des concentrés ont produit plus de poulains présentant des lésions d'ostéochondrose que les juments nourries uniquement avec des fourrages.**
Comme il avait été présenté dans le précédent chapitre, la nutrition du poulain durant sa croissance est particulièrement importante pour prévenir l'apparition de lésions d'ostéochondrose. Dans le projet Foetalim, les poulains ont été nourris grâce à un distributeur automatique de concentrés avec au moins 4 repas par jour. Ainsi, plus le poulain fait de repas et moins la quantité de sucre par repas est importante. Une hypothèse est que les poulains de cette étude auraient donc pu guérir de leurs lésions entre 6 et 18 mois grâce à ce dispositif. Comme la surnutrition a été réalisée après 18 mois (période à laquelle les lésions d'ostéochondrose se stabilisent chez les poulains) il n'y a pas d'effet de cette surnutrition sur les résultats des radiographiques réalisées à 24 mois.

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

2.4 Conclusions de l'étude

- Nourrir les juments avec des concentrés en fin de gestation permet de maintenir un état corporel stable et optimal tout au long de la gestation. Cependant cela altère leur métabolisme glucidique et augmente le risque pour les poulains de développer des lésions d'ostéochondrose au moins à 6 mois.

- Sous-nourrir modérément les juments avec des fourrages qui ne sont pas de qualité suffisante ou distribués en quantité insuffisante entraine un retard de maturité des poulains (maturité testiculaire à 12 mois, largeur des canons moins importante dès 19 mois) et altère le métabolisme des poulains au moins jusqu'à 19 mois.

- Une surnutrition des poulains après 20 mois entraîne une augmentation de l'adiposité et une altération de la régulation du stockage du glucose. Cela peut entraîner par la suite des pathologies qui diminueront les capacités des poulains voire arrêteront leur carrière sportive et/ou reproductive.

3. Conclusions générales et perspectives

En conclusion, si l'on reprend les résultats de l'étude FOETALIM et des autres études scientifiques réalisées sur le sujet, pour réduire l'ostéochondrose chez le poulain et optimiser sa capacité à réguler le stockage du glucose il faut :

- S'assurer que la poulinière est en bon état (optimal : 3 – 3,5 /5) mais pas trop grasse (éviter les notes d'état > 4).
- Bien nourrir la poulinière durant la gestation avec des fourrages en qualité et quantité suffisante, des compléments minéraux et vitaminiques, le moins possible de céréales, à fractionner en plusieurs repas.
- Après sevrage, nourrir le poulain avec des fourrages en qualité et quantité suffisante, des compléments minéraux et vitaminiques, le moins de céréales possibles. Si on utilise des céréales, il vaut mieux fractionner les apports en au moins 4 repas par jour et éviter de trop fortes vitesses de croissance.

La suite des projets « Foetalim » (projets encore en cours) vise à séparer l'effet de la surnutrition et de l'obésité maternelles durant la gestation de l'effet de l'apport de céréales. Les premiers résultats obtenus nous permettent de confirmer l'effet délétère de l'apport de céréales sur le développement de l'ostéochondrose chez le poulain (données non-publiées). Dans un deuxième temps, l'effet de l'obésité maternelle – avant et pendant la gestation- sur la santé du poulain est actuellement étudié. Enfin, nous envisageons des interventions nutritionnelles (compléments alimentaires) afin de réduire les effets négatifs de l'apport en céréales et/ou de l'obésité maternelle sur la santé du poulain après la naissance.

Remerciements

Nous souhaitons remercier l'Institut Français du cheval et de l'équitation et la station expérimentale des haras à Chamberet pour le soin et la gestion des animaux, l'assistance durant les castrations, les tests métaboliques et les radiographies.

Nous souhaitons également remercier la plateforme CMABIO3 de l'Université de Caen et spécialement Nicolas Elie pour son aide.

Nous remercions également l'Institut Français du cheval et de l'équitation, le Fonds Eperon et le département PHASE de l'INRA qui ont financé cette étude.

Références

Cavinder, C.A., Burns, S.A., Coverdale, J.A., Hammer, C.J., Holub, G., and Hinrichs, K. (2012). Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. Prof. Anim. Sci. *28*, 344–350.

Donabédian, M., Fleurance, G., Perona, G., Robert, C., Lepage, O., Trillaud-Geyl, C., Leger, S., Ricard, A., Bergero, D., and Martin-Rosset, W. (2006). Effect of fast vs. moderate growth rate related to nutrient intake on developmental orthopaedic disease in the horse. Anim. Res. *55*, 471–486.

George, L.A., Staniar, W.B., Treiber, K.H., Harris, P.A., and Geor, R.J. (2009). Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. Domest.

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

Anim. Endocrinol. *37*, 23–29.

Heyden, L.V., Lejeune, J.-P., Caudron, I., Detilleux, J., Sandersen, C., Chavatte, P., Paris, J., Deliège, B., and Serteyn, D. (2013). Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. Vet. Rec. *172*, 68–68.

Peugnet, P., Robles, M., Mendoza, L., Wimel, L., Dubois, C., Dahirel, M., Guillaume, D., Camous, S., Berthelot, V., Toquet, M.-P., et al. (2015a). Effects of Moderate Amounts of Barley in Late Pregnancy on Growth, Glucose Metabolism and Osteoarticular Status of Pre-Weaning Horses. PLoS ONE *10*, e0122596.

Peugnet, P., Wimel, L., Tarrade, A., Robles, M., Dubois, C., Serteyn, D., and Chavatte Palmer, P. (2015b). La santé du futur poulain se prépare dès la gestation. 41ème Journ. Rech. Équine *41*.

Ralston, S. (1996). Postprandial hyperglycemica/hyperinsulinemia in young horses with osteochondritis dissecans lesions. Pferdeheilkunde 320–322.

Steven, D., and Samuel, P. (1975). Anatomy of the placental barrier in the mare. J. Reprod. Fertil. Suppl. 579–582.

Thorson, J.F., Karren, B.J., Bauer, M.L., Cavinder, C.A., Coverdale, J.A., and Hammer, C.J. (2010). Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: Foaling data. J. Anim. Sci. *88*, 982–990.

Wilsher, S., and Allen, W.R. (2006). Effects of a Streptococcus equi infection--mediated nutritional insult during mid-gestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. Equine Vet. J. *38*, 549–557.

© Institut français du cheval et de l'équitation 2017

Vulgarisation 2 : La santé du poulain se prépare dès la gestation

Morgane Robles, Pascale Chavatte-Palmer.

Groupement pour l'Amélioration de l'Elevage de Trotteur Français (GAET)
Bulletin n°155, janvier 2017

Auteurs :
M. Robles et P. Chavatte-Palmer
UMR BDR, INRA, ENVA,
Université Paris Saclayl

La santé du poulain se prépare dès la gestation

Au cours de la domestication, le recours à la sélection génétique a permis une très forte amélioration des performances des animaux. La sélection s'appuie sur le recueil des performances et l'indexation génétique permettant de choisir les meilleurs reproducteurs. Des conditions d'élevage optimales permettent aux animaux d'exprimer au mieux leur potentiel génétique. Cependant des données scientifiques récentes montrent que l'amélioration de la santé et des performances des animaux pourrait aussi passer par des effets de l'environnement maternel durant la gestation. Cela s'applique aussi au cheval…

• La génétique ne fait pas tout

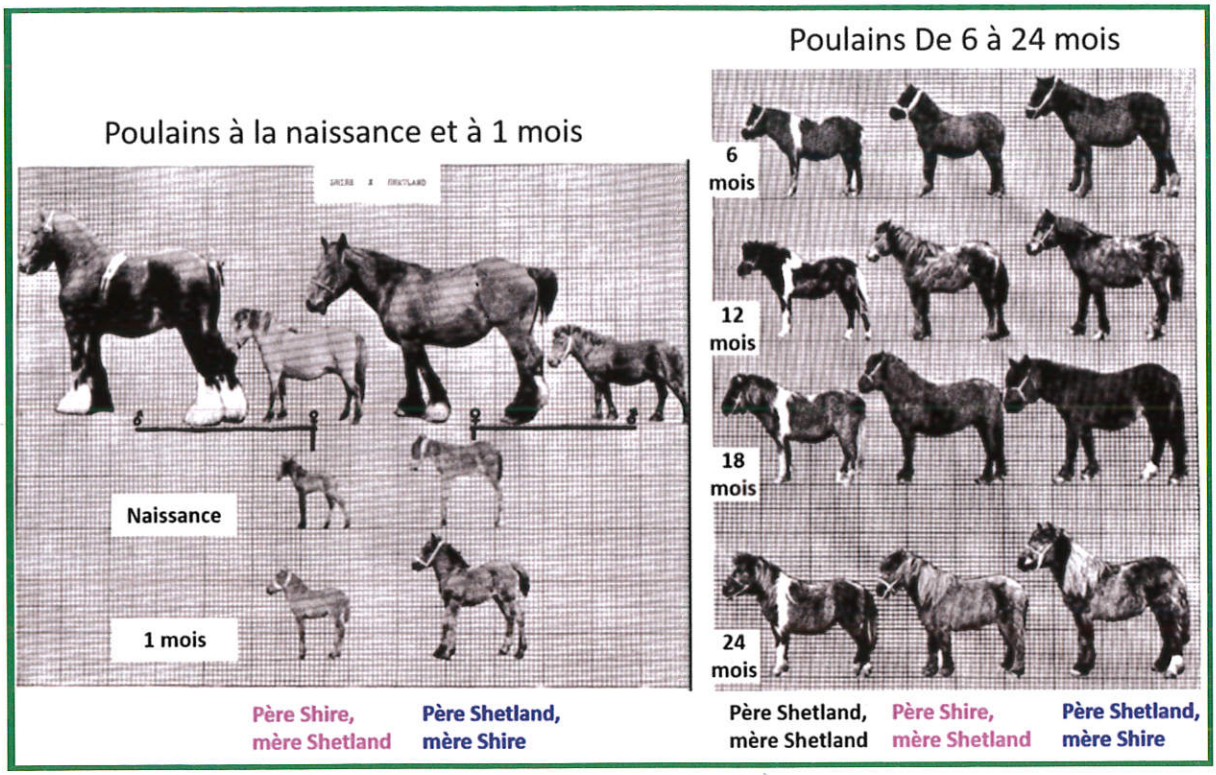
Il est important de prendre en compte la génétique de la jument et de l'étalon lorsque l'on souhaite produire un poulain. Mais la génétique ne fait pas tout. En effet, il est possible de modifier la manière dont l'information génétique est lue et interprétée. Par exemple la chatte Carbon Copy est la clone de la chatte tricolore Rainbow. Bien que ces deux chats partagent exactement le même matériel génétique, ils ne présentent pas la même robe car Carbon copy n'a pas été portée par la même mère que Rainbow. Ainsi son information génétique n'a pas été interprétée de la même manière

Rainbow et Carbon copy partagent la même information génétique mais ne se ressemblent pas (photographies de l'Université du Texas A&M).

Ce phénomène est impliqué dans les Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD) qui relient les évènements de la vie précoce (de la conception à la puberté) avec le risque de développer des maladies comme le diabète, l'obésité ou des maladies cardio-vasculaires à l'âge adulte. Ainsi, l'environnement au sens large (nutrition, exposition à des produits chimiques, stress psychologique) auquel l'individu sera confronté va modifier la manière dont son information génétique est interprétée par son organisme. Chez l'humain, les mécanismes de la DOHaD sont maintenant pris en compte dans la lutte contre l'épidémie d'obésité : la nutrition de la mère et de l'enfant a une place primordiale parmi les objectifs mondiaux de l'OMS pour l'horizon 2025.

Le cheval peut également développer des maladies métaboliques à l'âge adulte telles que le syndrome métabolique, l'obésité, la résistance à l'insuline, le syndrome de Cushing, la fourbure et l'ostéochondrose. La surnutrition et la sédentarité sont deux facteurs à l'origine de ces pathologies et l'obésité est devenue un véritable problème de santé publique au sein de la filière équine.

Il est donc particulièrement important de comprendre comment l'environnement maternel en gestation, ainsi que la nutrition du poulain durant sa croissance vont programmer sa santé à l'âge adulte et donc son utilisation futur



Les poulains issus d'une mère Shire et d'un père Shetland sont plus grands que les poulains issus d'un père Shire et d'une mère Shetland, au mois jusqu'à 2 ans (Photographies prises par l'Université de Cambridge).

• Bien choisir sa poulinière

Insémination artificielle :

Chez le cheval, le choix de la jument, en particulier sa taille, est très important. En 1938, il a été montré par des inséminations artificielles entre des poneys Shetland et des chevaux de trait Shire que la race de la mère avait une influence forte sur la croissance des poulains puisque les produits portés par une mère ponette Shetland étaient plus petits à la naissance que les produits portés par une jument de trait Shire. *(voir photo ci-dessus)*

Transfert d'embryons :

On s'interroge souvent sur le choix de la receveuse lors de transfert d'embryons. Souvent une jument de race différente de la donneuse est utilisée, ce qui pourrait avec des effets sur le poulain. Des transferts d'embryons entre races de petite taille (poney) et races de plus grande taille (cheval de selle, cheval de trait) ont été réalisés pour étudier la **fonction cardiovasculaire**, primordiale pour une bonne santé sportive et de bonnes performances futures du poulain ; la **régulation du stockage** du glucose dans les différents tissus de l'organisme (muscle, foie, gras), très importante pour la santé à long terme mais également pour les performances des individus, le glucose étant source d'énergie et l'**ostéochondrose**, qui est une maladie qui se stabilise à 1 an et demi. L'ostéochondrose a des origines génétiques mais aussi environnementales : une alimentation trop riche, une croissance trop rapide du poulain ou pas assez d'exercice durant la croissance augmentent le risque de développer des lésions. Les résultats montrent que ces paramètres sont affectés chez les poulains produits par une jument « trop grande » (embryon de poney transféré dans une jument de selle) ou « trop petite » (embryon de selle transféré dans une jument poney) en comparaison aux témoins (poney dans poney et cheval de selle dans cheval de selle).

Ainsi, il vaut mieux choisir une jument de la même race ou ayant la même taille que celle attendue pour le poulain à l'âge adulte comme poulinière ou comme receveuse d'embryon. *suite pages suivantes*

Auteurs :
M. Robles et P. Chavatte-Palmer
UMR BDR, INRA, ENVA,
Université Paris Saclayl

La santé du poulain suite...

Les poulains de race selle « restreints » sont nés immatures
(à gauche, photographie de l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière (UEPAO), à droite photographie de l'Université de Cambridge).

Bien nourrir sa poulinière et son poulain

L'alimentation de la jument en gestation et du poulain en croissance est également très importante.

Tout d'abord, il est important d'avoir des juments en bon état mais pas trop grasses au moment de l'insémination, la note d'état idéale étant 3,5.

En élevage, certaines juments sont nourries uniquement avec des fourrages durant toute la gestation (pâturage et/ou fourrage enrubanné), alors que d'autres reçoivent des céréales au boxe au moins pendant l'hivernage.

Les juments nourries avec seulement des fourrages perdent souvent un peu d'état durant la gestation mais une petite perte d'état de la jument n'affecte pas le poids du poulain à la naissance ni sa croissance.

En revanche, en cas de sous-nutrition sévère, le poids et la taille des poulains sont affectés.

Les juments nourries avec des céréales au cours de la gestation ne perdent en général pas d'état durant la gestation mais leurs poulains ont plus de chance de développer des lésions d'ostéochondrose que les poulains des juments nourries avec des fourrages seulement. De plus, le développement des testicules est avancé chez les mâles (ce qui pourrait indiquer une puberté plus précoce).

L'excès nutritionnel chez les poulains en croissance (après sevrage) augmente le gain moyen quotidien mais aussi la quantité de gras du poulain, augmente les risques de développer de l'ostéochondrose et réduit la capacité à réguler le stockage du glucose.

	Jument trop grande (poney dans cheval de selle)	Jument trop petite (cheval de selle dans poney)
Croissance	Poulains plus grands au moins jusqu'à 3 ans	Poulains faibles et immatures à la naissance, plus petits jusqu'au sevrage. La croissance relative des différents segments osseux est différente des témoins après sevrage.
Fonction cardiovasculaire	Poulains moins bien capables de réguler leur tension artérielle à la naissance	
Métabolisme	Poulains moins bien capables de réguler le stockage du glucose dans les organes au moins jusqu'à 6 mois	
Ostéochondrose	Pas de changement	Augmentation des risques d'ostéochondrose à 6 mois

Conclusion

Pour réduire l'ostéochondrose chez le poulain et optimiser sa capacité à stocker du glucose, il faut :

- **Choisir une poulinière de taille et format proche de la taille estimée du futur poulain à l'âge adulte. Si possible, choisir la même race.**

- **S'assurer que la poulinière est en bon état (optimal : note d'état de 3,5) mais pas trop grasse (éviter les notes d'état >4)**

- **Bien nourrir la poulinière durant la gestation avec des fourrages en qualité et quantité suffisante, des compléments minéraux et vitaminiques, le moins possible de céréales, à fractionner en plusieurs repas.**

- **Après sevrage, nourrir le poulain avec des fourrages en qualité et quantité suffisante, des compléments minéraux et vitaminiques, le moins de céréales possible. Si on utilise des céréales, il vaut mieux fractionner les apports en au moins 4 repas par jour et éviter de trop fortes vitesses de croissance.**

Titre : Influence du métabolisme maternel sur la fonction placentaire et la santé du poulain

Mots clés : DOHaD, placenta, Cheval, Nutrition, Métabolisme, programmation développementale

Résumé : L'économie de la filière équine repose aujourd'hui sur la production de chevaux athlètes performants sur le long terme. Le métabolisme de la jument gestante peut programmer le développement du poulain, sa santé à long terme et donc ses performances sportives à l'âge adulte. De nombreuses pratiques d'élevage peuvent modifier le métabolisme maternel, telles que la nutrition durant la gestation, la surnutrition durant la vie de la jument (surpoids et obésité) et le nombre de poulains produits par la jument (parité). L'objectif de ce travail était d'étudier les effets du métabolisme maternel durant la gestation sur la fonction et la structure placentaire à terme, la croissance osseuse, le métabolisme énergétique, l'inflammation systémique et le statut ostéoarticulaire des poulains en croissance. Un premier modèle de perturbation nutritionnelle en fin de gestation a été développé en comparant des juments ayant ingéré uniquement des fourrages au cours de la gestation ou bien des fourrages et des concentrés à partir de la mi-gestation. Ce modèle a permis de montrer que la supplémentation en concentrés altérait le métabolisme glucidique maternel, la fonction placentaire ainsi que le statut ostéoarticulaire et la réponse métabolique à un challenge de surnutrition chez le poulain. D'autre part, une perte d'état trop importante associée à une qualité/quantité de foin insuffisante entrainait un retard de maturité des fonctions de métabolisme énergétique et de reproduction mâle chez les poulains. Un deuxième modèle a ensuite été développé pour étudier l'effet de la primiparité. Cette étude a confirmé que la croissance fœtale des poulains issus des juments primipares était réduite et que ces poulains demeuraient plus petits avec un métabolisme glucidique et une maturation testiculaire retardés par rapport aux poulains issus de juments multipares. Le troisième modèle développé s'est intéressé à l'effet de l'obésité maternelle dès la conception. En effet, la prévalence de surpoids et d'obésité est de plus en plus importante au sein de la filière équine. Ce dernier modèle a permis de montrer que l'obésité maternelle associée à une résistance à l'insuline et une inflammation systémique augmentées entrainait une augmentation de la résistance à l'insuline, de l'inflammation systémique et du développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains. L'ensemble de ces résultats met en avant la relation entre la résistance à l'insuline maternelle, l'inflammation maternelle et le développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains durant la croissance, mais également entre sous-nutrition utérine et retard de maturité. Ces observations vont permettre de développer de nouvelles recommandations nutritionnelles pour les poulinières.

Title : Influence of maternal metabolism on placental function and health of foal

Keywords : DOHaD, placenta, horse, nutrition, metabolism, developmental programming

Abstract : The economy of the equine industry is based on the production of high performance athlete horses. The metabolism of the pregnant mare can program the development of the foal, its long-term health and therefore its athletic performance at adulthood. Many breeding practices can modify maternal metabolism, such as nutrition during pregnancy, overnutrition during the mare's productive life (overweight and obesity) and the number of foals produced by the mare (parity). The aim of this work was to study the effects of maternal metabolism during pregnancy on placental function and structure, as well as bone growth, energy metabolism, systemic inflammation and osteoarticular status in growing foals. In a first approach, mares fed with forage only during gestation were compared to mares fed forage and concentrates from mid-gestation. Supplementation with concentrates altered maternal carbohydrate metabolism and placental function. In weaned foals, the osteoarticular status and the metabolic response to an overnutrition were also affected by the use of concentrates in maternal nutrition. Conversely, mares fed forage only lost body condition, which led to a delay in the post-natal maturation in terms of energy metabolism and testicular function in foals. In a second approach, the effect of primiparity was studied. Foals born to primiparous mares were growth restricted at birth and had a long-term maturational delay in bone growth, carbohydrate metabolism and testicular function. Finally, given the current high prevalence of overweight and obesity in the equine species, the effects of maternal obesity were studied. Maternal obesity associated with increased maternal insulin resistance and systemic inflammation resulted in increased insulin resistance, systemic inflammation, and increased incidence of osteochondrosis in foals. Altogether, these results highlight the relationship between maternal insulin resistance, maternal inflammation and the development of osteochondrosis lesions in foals during growth, but also between in utero undernutrition and maturation delay. These observations will contribute to adjust nutritional recommendations to broodmares.