



HAL
open science

L'apeline, un marqueur d'intérêt chez la femme enceinte obèse ?

Sandy Hanssens-Gilbert

► **To cite this version:**

Sandy Hanssens-Gilbert. L'apeline, un marqueur d'intérêt chez la femme enceinte obèse ?. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S030 . tel-02293623

HAL Id: tel-02293623

<https://theses.hal.science/tel-02293623>

Submitted on 21 Sep 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.

Université Droit et Santé de Lille 2

Ecole doctorale Biologie-Santé

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2

Discipline : Physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale

Spécialité : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Sandy HANSSENS

le 29 Septembre 2017

**L'apeline : un marqueur d'intérêt
chez la femme enceinte obèse ?**

Professeur Marie-Victoire SENAT

Président du jury

Professeur Marc BARDOU

Rapporteur

Professeur Géraldine GASCOIN

Rapporteur

Professeur Jean LESAGE

Examineur

Professeur Philippe DERUELLE

Directeur de thèse

Unité de recherche : *Environnement Périnatal et Santé (EA 4489)*
Faculté de Médecine Pôle Recherche, Lille

REMERCIEMENTS

A mon Directeur de Thèse,

Monsieur le Professeur Philippe Deruelle

Professeur de Gynécologie-Obstétrique de l'Université Lille II

Service d'Obstétrique - Hôpital Jeanne de Flandre

Centre Hospitalier Universitaire de Lille - France

Merci Philippe, de m'avoir accompagnée et encouragée, depuis mon internat jusqu'à aujourd'hui, et de m'avoir proposé ce projet passionnant sur le système apelinergique chez les femmes enceintes obèses.

Merci de ta disponibilité et de ta patience.

Sois assuré de mon amitié sincère.

A la Présidente de mon Jury de Thèse,

Madame le Professeur Marie-Victoire Sénat

Professeur de Gynécologie-Obstétrique de l'Université du Kremlin-Bicêtre

Service de Gynécologie-Obstétrique

Centre Hospitalier Bicêtre - France

Je vous remercie d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et suis conscient de la chance de pouvoir profiter de votre expérience.

A mes rapporteurs,

Monsieur le Professeur Marc Bardou

Professeur de Gastro-entrérologie et d'Hépatologie de l'Université de Bourgogne

Centre Hospitalier Universitaire de Dijon - France

Madame le Professeur Géraldine Gascoin

Professeur de Pédiatrie de l'Université d'Angers

Service de Pédiatrie

Centre Hospitalier Universitaire d'Angers - France

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de partager vos commentaires qui enrichiront et feront progresser ce projet de recherche.

A l'Examineur de ma Thèse,

Monsieur le Professeur Jean Lesage

Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1

Lille - France

Merci Jean, de m'avoir aidée et soutenue lors de la réflexion sur ce projet. J'ai énormément appris en travaillant à tes côtés. Merci de m'avoir fait partager ta grande connaissance sur le système apelinergique.

A tous ceux qui m'ont accompagnée durant ce travail,

Monsieur le Professeur Laurent Storme

Professeur de Néonatalogie de l'Université de Lille 2, Service de Réanimation néonatale,
CHRU de Lille – France

Merci pour vos enseignements et votre expérience unique dans le domaine de la périnatalité.

Madame le Professeur Véronique Debarge

Professeur de Gynécologie-Obstétrique de l'Université de Lille 2, Service de Gynécologie-
Obstétrique, CHRU de Lille – France

Merci pour tes conseils toujours pertinents et ton soutien au long de ces années.

Delphine Eberlé,

Lucie Marousez,

Merci pour vos précieux conseils et merci et m'avoir transmis votre rigueur scientifique.

Laura Butruille,

Emmanuelle Moitrot,

Merci d'avoir partagé votre expérience et de m'avoir entourée lors de mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci pour entrain et votre bonne humeur qui font qu'aujourd'hui nous continuons à passer des moments mémorables.

Céline Petit,

Xirui Wang,

Audrey Leroy,

Aurore Marx-Deseure,

Merci sincèrement à vous quatre pour le travail accompli sur ce projet dans le cadre de vos Master 2 respectifs et l'énergie que vous avez investie. Vous savez l'importance de votre rôle pour la progression de ce travail au quotidien. Merci de m'avoir accompagné pendant ces trois années de thèse.

Armande Subayi,

Pierrette Perimenis,

Merci d'avoir été là durant cette année inoubliable qu'était mon Master 2.

Merci au Professeur Anne Vambergue (Endocrinologie – CHRU de Lille) et au Professeur Steve Lancel (Université Lille 2) d'avoir accepté de participer à mes Comités de Suivi de Thèse et d'avoir ainsi enrichi de votre expérience notre réflexion.

Merci à l'équipe de l'unité Inserm U859 « Biothérapie du Diabète » des Professeurs François Pattou et Julie Kerr-Conte pour leur accueil et leur disponibilité.

Merci à toute l'équipe EA 4489 Environnement Périnatal et Santé de m'avoir accompagnée au long de ces 3 années.

Merci à toute l'équipe de la Fédération de la Recherche Clinique (CHRU de Lille)

Merci à toute l'équipe du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche expérimentale (DHURE – Faculté de Médecine – Pôle Recherche – CHRU de Lille)

Merci à mes parents pour l'amour qu'ils me témoignent et leurs encouragements.

REMERCIEMENTS

A Philippe, Alexandre et Romain.

RÉSUMÉ

Introduction : L'obésité, problème majeur de santé publique, est en augmentation constante. Elle est responsable d'une altération de la sécrétion des adipokines, telles que l'apeline. L'apeline est impliquée dans diverses fonctions de l'organisme et notamment dans la régulation du métabolisme énergétique. Au cours de la grossesse, ce système semble avoir un rôle crucial dans le développement fœto-placentaire. Le système apelinergique chez la femme enceinte obèse n'a encore jamais été étudié.

Objectif : L'objectif de cette thèse était de vérifier si le système apelinergique est modifié en cas d'obésité chez la femme enceinte, tout d'abord par une approche expérimentale sur un modèle de souris obèse et insulino-résistante, puis par une approche translationnelle vers l'humain (étude OB-APE).

Matériel et méthode :

Modèle murin : 40 souris femelles ont été réparties en 2 groupes : Témoin (T, n=20) et High Fat (HF, n=20). Après 3 mois de régime, les souris étaient mises en reproduction. Des prélèvements étaient réalisés à E6.5, E12.5 et E18.5. Lors du sacrifice à E18.5, la glycémie à jeun, l'insulinémie, l'apelinémie maternelle et fœtale étaient dosées, les souriceaux et les placentas étaient pesés. La moitié de chaque placenta était mis dans du RNA later et l'autre moitié était mis dans de l'azote liquide. Les prélèvements étaient conservés à -80°C.

Etude chez l'humain (étude OB-APE) : Etude prospective et comparative menée au sein de la maternité Jeanne de Flandre (Lille, France) entre mai 2016 et juillet 2017. Les patientes incluses étaient réparties en 3 groupes: N (normal, n= 30), O (obèses, n = 30) et ODG (obèse avec diabète gestationnel, n = 30). Trois prélèvements plasmatiques maternels d'apeline étaient réalisés : entre 35 et 40 SA), à l'accouchement et au 2^{ème} jour du post-partum, ainsi qu'un prélèvement néonatal au cordon ombilical. Des fragments placentaires étaient prélevés à l'accouchement et du colostrum était récupéré à J2 en post-partum. Les dosages de l'apeline dans le plasma et dans le colostrum étaient réalisés par ELISA. L'expression placentaire de l'apeline et d'APJ était étudiée par RT-PCR quantitative. La sécrétion placentaire était étudiée dans un milieu nutritif standard (DMEM) ainsi qu'en présence d'insuline (50nM) ou d'angiotensine II (AT2, 1nM).

Résultats :

Modèle murin : Après 3 mois de régime, les souris HF étaient obèses et intolérantes aux hydrates de carbone. Il n'y avait pas de différence d'apelinémie à jeun entre les souris T et HF hors gestation. Les placentas des souriceaux HF avaient un poids supérieur à ceux des portées T ($P=0.006$). Il y avait au cours de la gestation une diminution de l'apelinémie dans les 2 groupes en fin de gestation, de façon plus importante dans le groupe HF que dans le groupe Témoin ($P = 0.01$). Chez les souris obèses, il y avait une augmentation de l'insulinorésistance en fin de gestation par rapport au groupe T ($P<0.05$). L'expression placentaire de l'apeline et d'APJ était augmentée dans les placentas de souris obèses.

Etude chez l'humain (étude OB-APE) : L'apelinémie maternelle était diminuée dans les groupes O et ODG en comparaison avec le groupe N aux 3 temps de l'étude. L'apelinémie néonatale était également diminuée dans ces mêmes groupes. Les concentrations en apeline dans le colostrum étaient à l'inverse plus élevées dans les groupes O et ODG que dans le groupe N ($P = 0,007$ et $P = 0,05$ respectivement). Ex-vivo, la sécrétion placentaire était diminuée dans les groupes O et ODG en comparaison avec le groupe N. L'ajout d'insuline dans le milieu entraînait une augmentation de la sécrétion d'apeline, alors que l'ajout d'AT2 aboutissait à une diminution de cette sécrétion. L'expression placentaire de l'ARNm d'APJ était plus importante dans les placentas de femmes obèses que chez patientes d'IMC normal (N).

Conclusion :

Au cours de la grossesse, l'obésité est associée à des modifications du système apelinergique. Chez la souris obèse, il y avait une hyperapelinémie au cours de la gestation avec une moindre diminution à E18.5. Chez la femme obèse, l'apelinémie était diminuée au cours de la grossesse, tandis que les concentrations d'apeline dans le colostrum étaient augmentées. Au niveau placentaire, l'expression de l'apeline et d'APJ était augmentée chez les sujets obèses. Il y avait une sécrétion ex-vivo d'apeline dans les placentas murin et humain, moindre chez les sujets obèses. Chez l'humain, cette sécrétion était modulée par l'ajout d'insuline ou d'AT2. Il semble que l'apeline puisse être un acteur clé de la régulation de l'adiposité, de l'insulinorésistance et qu'elle joue probablement un rôle important dans le développement de l'unité fœto-placentaire.

Mots-clés : grossesse, obésité, apeline, APJ, placenta, lactation, diabète gestationnel

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a major public health problem and is constantly increasing. Obesity alters the adipokines' secretion, such as apeline. Apeline is involved in various functions, such as energy metabolism regulating. During pregnancy, the apelinergic system seems to be crucial for fetal development. The apelinergic system in obese pregnant women has never been studied before.

Objective: The aim of this thesis was to verify whether the apelinergic system is modified in case of obesity in pregnant women, first by an experimental approach on an obese and insulin-resistant mouse model and then by a translational approach to the human (OB-APE study).

Material and methods :

Murine model: 40 female mice were divided into 2 groups: Control (C, n = 20) and High Fat (HF, n = 20). After 10 weeks of diet, mice were mated. Samples were taken at E6.5, E12.5 and E18.5. Mice were sacrificed by decapitation at E18.5 and blood samples were collected. Fetuses and placentas were collected after cesarean section and weighed. Fasting blood glucose, insulinaemia, maternal and fetal apelinemia were measured. At E18.5, blood samples of fetuses were collected and placentas were frozen and stored at -80°C.

Human model (OB-APE study) : Prospective and comparative study conducted in Jeanne de Flandre maternity (Lille, France) between May 2016 and July 2017. Patients were divided into 3 groups: group N (normal, n=30), group O (obese, n=30) and group ODG (obese with diabetes mellitus, n=30). The maternal plasma samples were obtained at 3 different times: at the end of pregnancy (35-40 weeks of gestation), at delivery and at day 2 in postpartum, as well as a neonatal umbilical cord sampling. Placental fragments were collected at delivery and colostrum was recovered on day 2 in postpartum.

The measures of apelin concentrations in plasma and colostrum were performed by ELISA. The placental expression of apelin and APJ was studied by quantitative RT-PCR. Placental secretion was studied in a standard nutrient medium (DMEM) as well as in presence of insulin (50nM) or angiotensin II (AT2, 1nM).

Results:

Murine model: After 3 months of diet, HF mice were obese and intolerant to carbohydrates. There was no significant difference in fasted apelinemia between non-pregnant T and HF mice. The placentas of HF mice were heavier than controls ($P=0.006$). There was an increase in apelinemia at E12.5 in the 2 groups ($P<0.05$), higher in the group HF (4.89 ± 1.18 ng/mL, vs 2.44 ± 0.42 ng/mL, $P<0.001$). In obese mice, there was an increase in insulin-resistance at the end of pregnancy compared to the group T ($P<0.05$). The placental expression of apelin and APJ was increased in obese mice.

Human model (OB-APE study) : Maternal apelinemia was decreased in the O and ODG groups in comparison with the N group at the 3 times of the study. Neonatal apelinemia was also decreased in these groups. The apelin concentrations in colostrum were higher in the groups O and ODG than in the group N ($P=0.007$ and $P=0.05$ respectively).

Ex-vivo, placental secretion of apelin was decreased in the groups O and ODG compared to the group N. The addition of insulin in the medium led to an increase in apelin secretion, whereas the addition of AT2 led to a diminution of this secretion. Placental expression of APJ mRNA was greater in placentas of obese women than in normal (N) patients.

Conclusion:

During pregnancy, obesity is associated with changes in the apelinergic system. In obese mice, there was an hyperapelinemia during gestation with a smaller decrease in late pregnancy. In obese women, apelinemia was decreased during pregnancy, while the concentrations of apelin in colostrum were increased. In placenta, the expression of apelin and APJ was increased in obese subjects. *Ex-vivo,* there was a secretion of apelin in the murine and human placentas, less in obese subjects. In humans, this secretion was modulated by the addition of insulin or AT2. Apelin appears to be a key player in the regulation of adiposity, insulin-resistance and seems to be crucial for fetal development.

Keywords: pregnancy, obesity, apelin, APJ, placenta, lactation, diabetes mellitus

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

○ Articles publiés

S. HANSSENS, A. MARX-DESEURE, S. LECOUTRE, L. BUTRUILLE, A. FOURNEL, C. KNAUF, C. BESANGEZ, C. BRETON, L. STORME, P. DERUELLE, J. LESAGE. Maternal obesity alters the apelinergic system at the feto-maternal interface. *Placenta* (2016) 39:41-44.

H. AZAIS, A. LEROY, L. GHESQUIERE, P. DERUELLE, S. HANSSENS. Effects of adipokines and obesity on uterine contractility. *Cytokines* (2016) 34:59-66.

S. HANSSENS, M. SALAZET, D. VINATIER. Immunological aspect of pregnancy. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* (2012) 41 :595-611.

○ Articles soumis

D. EBERLE, L. MAROUSEZ, L. BUTRUILLE, S. HANSSENS, S. LECOUTRE, C. GUINEZ, C. POUPRE, C. LABORIE, P. DERUELLE, C. BRETON, J. LESAGE. Physiology of the apelinergic system during gestation : focus of the fetoplacental unit in normal and complicated pregnancy. *Journal of Endocrinology* (soumis).

L. GHESQUIERE, H. AZAIS, A. LEROY, P. DERUELLE, S. HANSSENS. Interest of sports during pregnancy in obese pregnant women: the key role of adipokines. *Sport and adipokines. Science et Sports* 2017 (soumis).

○ **Communications orales et affichées**

• **COMMUNICATIONS ORALES**

- ❖ Groupement de la Francophonie Placentaire, Munich, juin 2015
- ❖ European Genomic Institute for Diabetes, France, prévue en septembre 2015

• **COMMUNICATIONS AFFICHEES**

En anglais :

- ❖ Society of Maternal and Fetal Medicine, New Orleans, février 2014
- ❖ Earlynutrition, Munich, mars 2014
- ❖ Journées André Verbert 2016

En français :

- ❖ Société Française de Médecine Périnatale, novembre 2013
- ❖ Journées Francophones de Recherche en Néonatalogie, décembre 2013
- ❖ Journées nationales des Gynécologues et Obstétriciens en formation, décembre 2013
- ❖ Collège Régional des Gynécologues et Obstétriciens Français, décembre 2013

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Altérations du tissu adipeux blanc, brun et beige impliqué dans le développement de l'obésité et de ses comorbidités

Figure 2 : Expression de l'ARN messager de l'apeline et d'APJ dans les différents tissus, chez la souris mâle

Figure 3 : Voies de signalisation impliquées dans l'utilisation du glucose par le muscle induite par l'apeline

Figure 4 : Séquences en acides aminés des différentes isoformes de l'apeline

Figure 5 : Schéma simplifié du système rénine-angiotensine

Figure 6 : Effets métaboliques de l'injection aiguë ou chronique au niveau central chez la souris de poids normal

Figure 7 : Voies de signalisation responsables de la vasodilatation/vasoconstriction en réponse à l'apeline

Figure 8 : Mécanismes proposés pour l'effet inotrope positif induit par l'apeline

Figure 9 : Effets métaboliques de l'apport aigu ou chronique exogène d'apeline au niveau périphérique

Figure 10 : Principales actions de l'apeline

Figure 11 : Séquences des peptides apeline et ELABELA/Toddler, apeline-36, [Pyr¹]apelin-13, Elabela-32; Elabela-21, Elabela-11

Figure 12 : Schématisation de l'inflammation du tissu adipeux

Figure 13 : Conséquences de l'obésité maternelle sur le développement du placenta et du fœtus

Figure 14 : Schéma de l'étude sur la souris

Figure 15 : Apelinémie à 3 mois à 8 heures chez les souris T et HF, à jeun et ad libitum

Figure 16 : Rythme circadien de l'apelinémie chez les souris femelles âgées de 18 semaines

Figure 17 : Frottis vaginaux colorés au crystal violet et apelinémie en fonction de la période du cycle

œstral

Figure 18 : Evaluation de la prise alimentaire chez la souris

Figure 19 : Poids des souris en fonction de leur régime alimentaire

Figure 20 : Glycémie lors de l'OGTT, insulinémie à jeun, HOMA-IR chez les souris des groupes T et HF après 3 mois de régime chez les souris de poids normal et obèses

Figure 21 : Apelinémie à 3 mois chez les souris T et HF

Figure 22 : Prise de poids au cours de la gestation chez les souris et variation du poids chez les souris T et HF

Figure 23 : Glycémie à jeun, insulinémie à jeun, HOMA-IR et apelinémie à jeun hors gestation et au cours de la gestation à E6.5, E12.5 et E18.5 chez les souris T et HF

Figure 24 : Apelinémie à jeun à E18.5 chez les mères et les souriceaux des groupes T et HF

Figure 25 : Expression placentaire de l'apeline à E18.5 chez la souris

Figure 26 : Sécrétion d'apeline par le placenta murin

Figure 27 : Schéma de l'étude OB-APE

Figure 28 : Prélèvements placentaires chez l'humain

Figure 29 : Flow chart de l'étude OB-APE

Figure 30 : Apelinémie maternelle au 3^{ème} trimestre et au 2^{ème} jour du post-partum chez la femme

Figure 31 : Corrélations entre l'apelinémie maternelle et les caractéristiques pondérales maternelles

Figure 32 : Modifications du bilan glycémique plasmatique maternel au cours de la grossesse (glycémie, insulinémie, peptide C et HOMA-IR)

Figure 33 : Corrélations entre l'apelinémie maternelle et la glycémie à jeun, et l'HOMA-IR au 3^{ème} trimestre de la grossesse.

Figure 34 : Apelinémie maternelle et néonatale à l'accouchement

Figure 35 : Corrélations entre l'apelinémie néonatale et l'IMC maternel préconceptionnel, et la prise de poids maternelle.

Figure 36 : Courbe d'amplification de l'amorce apeline: amplification d'un pool d'ADNc de 3 groupes

Figure 37 : Courbe d'efficacité de l'amorce apeline: l'amplification d'un pool d'ADNc de 3 groupes

Figure 38 : Expression placentaire d'APJ dans les groupes N, O et ODG

Figure 39 : Courbe de linéarité du dosage de la sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo chez des patientes d'IMC normal (N, n=4) ou obèses (O, n=4) après 12 heures d'incubation

Figure 40 : Sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo chez n=6 patientes dans les 3 groupes à 12 heures d'incubation avec ou sans utilisation du Belzer

Figure 41 : Sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo à terme dans les groupes N, O et ODG après 2 heures, 6 heures et 12 heures d'incubation (n=10 par groupe)

Figure 42 : Sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo dans le milieu DMEM et après ajout d'insuline ou d'angiotensine chez les patientes des groupes N, O et ODG (n= 10 par groupe)

Figure 43 : Courbe de linéarité du dosage du colostrum. a : chez les patientes du groupe N (n=4) ; b : chez les patientes du groupe O (n=4)

Figure 44 : Concentration moyenne en apeline dans le colostrum chez des patientes de poids normal en utilisant comme mode de recueil soit l'expression manuelle (EM), soit le tire-lait (TL)

Figure 45 : Faisabilité et acceptabilité du prélèvement en fonction du mode de recueil, douleur ressentie au moment du prélèvement et durée du prélèvement

Figure 46 : Taux d'apeline dans le colostrum et dans le plasma en post-partum

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des phénotypes associés au récepteur de l'apeline

Tableau 2 : Composition des Régimes Normo-Calorique (T) et High Fat (HF)

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR chez la souris

Tableau 4 : Paramètres morphologiques après 6 heures de jeûne chez les femelles âgées de 27 à 30 semaines à E18.5

Tableau 5 : Données du sacrifice à E18.5 dans les groupes T et HF

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR, chez la souris (1) et chez l'humain

Tableau 7 : Caractéristiques maternelles

Tableau 8 : Bilan lipidique maternel

Tableau 9 : Caractéristiques du nouveau-né

Tableau 10 : Marqueurs glycémiques et lipidiques plasmatiques veineux néonataux (au cordon ombilical)

ABRÉVIATIONS

α MSH : α -Melanocyte Stimulating Hormone

ACE2 : Angiotensin-Converting Enzyme related carboxypeptidase 2

AMPK : Adénosine MonoPhosphate Kinase

ApoA : Apolipoprotéine A

ApoB : Apolipoprotéine B

AT1 : Angiotensine I

AT2 : Angiotensine II

CBP : Centre de Biologie Pathologique

CHRU : Centre Hospitalier Régional et Universitaire

CIC : Centre d'Investigation Clinique

CO₂ : Dioxyde de carbone

CRH : Corticotropin Releasing Hormone

CRP : Protéine C Réactive

DHEA : DéHydroEpiAndrostérone

DHURE : Département Hospitalo-Universitaire en Recherche Expérimentale

DG : Diabète Gestationnel

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DT1 : Diabète de Type 1

DT2 : Diabète de Type 2

EM : Expression Manuelle

ENNS : Etude Nationale Nutrition Santé

ERK : Kinases Régulées par le système Extra-cellulaire

ESM : Ecart standard à la Moyenne

FFA : Acides Gras Libres

FIL : Feedback Inhibitor of Lactation

FTO : FaT mass and Obesity associated

GH : Hormone de Croissance

GLUT 2 : Transporteur du Glucose 2

HCG : Hormone Chorionique Gonadotrophine Humaine

HF : High Fat diet

HPGH : Hormone de Croissance Placentaire

HPL : Hormone Placentaire Lactogène

HPO : Hyperglycémie Provoquée par voie Orale

HTA : Hypertension artérielle

ICV : Injection IntraCérébroVentriculaire

Ig : ImmunoGlobulines

IGF : Insulin Growth Factor

IHAB : Initiative Hôpital Ami des Bébés

IL : InterLeukine

IMC : Indice de Masse corporelle

IRS 1 : Insulin Receptor Substrate 1

J2 : 2^{ème} jour

KO : Knocked-Out

N : Normal

NO : Oxyde Nitrique

O : Obèse

O₂ : Oxygène

OB-APE : Obésité-APEline

ODG : Obèse avec Diabète Gestationnel

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAG : Petit pour l'Âge Gestationnel

PAI 1 : Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène 1

PE : Pré-Eclampsie

PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase

PIGF : Placental Growth Factor

PKB : Protéine Kinase B

PNNS : Programme National Nutrition Santé

POMC : Proopiomélanocortine

PP : Post-Partum

PPAR α : Peroxysome Proliferator Activated Receptor- α

PRCP : PROxyl CarboxiPeptidase

PVN : Noyaux ParaVentriculaires

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

SA : Semaines d'Aménorrhée

sFlt1 : Soluble fms-like tyrosine kinase 1

SGLT1 : Sodium GLucose co-Transporter 1

SNAT 4 : Sodium coupled Neutral Aminoacid Transporter 4

SON : Noyaux SupraOptiques

SOPK : Syndrome des Ovaires PolyKystiques

SRA : Système Rénine-Angiotensine

SSI : Sérum Salé Isotonique

TA : Tissu Adipeux

TAL : Transport Automatique Léger

TL : Tire-Lait

TLR : Toll Like Receptor

TNF α : Tumor Necrosis Factor- α

T : Témoin

T2 / T3 : 2^{ème} Trimestre / 3^{ème} Trimestre

TG : TriGlycérides

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	31
I. OBESITE ET ADIPOKINES	34
<i>I.1. Obésité et tissu adipeux</i>	<i>34</i>
<i>I.2. Adipokines</i>	<i>35</i>
I.2.1. LEPTINE.....	35
I.2.2. ADIPONECTINE	37
I.2.3. RESISTINE.....	37
I.2.4. VISFATINE	38
I.2.5. APELINE.....	38
II. LE SYSTEME APELINERGIQUE	40
<i>II.1. LE RECEPTEUR APJ</i>	<i>40</i>
II.1.2. Localisation.....	40
II.1.3. Action paracrine/autocrine/endocrine	40
II.1.4. Internalisation	40
II.1.5. Les voies de signalisation.....	40
<i>II.2. L'APELINE.....</i>	<i>42</i>
II.2.1. Peptide Apeline	42
II.2.2. Biosynthèse et dégradation	42
II.2.3. Les différentes fonctions du système apelinergique dans l'organisme	45
II.2.4. Origine de l'apeline plasmatique et ses modulations.....	54
II.2.5. Apeline chez l'individu obèse	55
<i>II.3. ELABELA / Toddler.....</i>	<i>56</i>

III. LE SYSTEME APELINERGIQUE AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE	57
<i>III.1. Grossesse normale</i>	<i>57</i>
III.1.2. Taux d'apeline plasmatique d'apeline chez la mère au cours de la grossesse	57
<i>III.2. Le placenta.....</i>	<i>58</i>
III.2.1. Rôles du placenta.....	58
III.2.2. Le système apelinergique dans le placenta.....	58
<i>III.3. Le fœtus</i>	<i>60</i>
III.3.1. Le taux d'apeline plasmatique chez le fœtus.....	61
III.3.2. Le système apelinergique chez le fœtus.....	62
III.3.3. Croissance fœtale.....	63
III.3.4. Troubles de la croissance fœtale	64
<i>III.4. Accouchement : Rôle de l'apeline dans la contractilité myométriale.....</i>	<i>65</i>
<i>III.5. Nouveau-né.....</i>	<i>66</i>
III.5.1. Apelinémie chez le nouveau-né	66
III.5.2. Système apelinergique chez le nouveau-né.....	66
<i>III.6. Allaitement.....</i>	<i>66</i>
III.6.1. Allaitement maternel et diminution du risque d'obésité à l'âge adulte chez l'enfant.....	66
III.6.2. Apeline et lactation	67
IV. LE SYSTEME APELINERGIQUE AU COURS DE LA GROSSESSE PATHOLOGIQUE	68
<i>IV.1. La pré-éclampsie.....</i>	<i>68</i>
<i>IV.2. Le diabète.....</i>	<i>74</i>
<i>IV.3. L'obésité.....</i>	<i>75</i>
OBJECTIFS DE LA THÈSE	80

1^{ère} PARTIE : Modèle animal	81
MATERIELS ET METHODE	83
RÉSULTATS	89
☞ Validation des conditions de dosage de l'apelinémie chez la souris	90
☞ Validation du modèle d'obésité induit par un régime hypercalorique hyperlipidique chez la souris.....	94
☞ Modulations de l'apelinémie chez la souris obèse et chez son souriceau au cours de la gestation	94
☞ Modulation par l'obésité de l'expression de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ et de la sécrétion placentaire d'apeline	103
CONCLUSION DE LA 1^{ère} PARTIE	105
2^{ème} PARTIE : Etude OB-AOE	107
MATERIELS ET METHODE	109
<i><u>II.1. Objectif principal et objectifs secondaires</u></i>	<i>110</i>
<i><u>II.2. Conception de la recherche</u></i>	<i>110</i>
<i>II.2.1. Type d'étude</i>	<i>110</i>
<i>II.2.2. Population étudiée</i>	<i>111</i>
<i>II.2.3. Déroulement de l'étude</i>	<i>112</i>
<i><u>II.3. Critères d'évaluation</u></i>	<i>113</i>
<i><u>II.4. Techniques</u></i>	<i>113</i>
<i>II.4.1. Collections biologiques</i>	<i>113</i>
<i>II.4.2. Dosages biologiques</i>	<i>115</i>
<i>II.4.3. Sécrétions placentaires d'apeline</i>	<i>115</i>
<i>II.4.4. Expression placentaire de l'ARNm de l'apeline et d'APJ</i>	<i>116</i>
<i><u>II.5. Analyse statistique</u></i>	<i>117</i>
<i>II.5.1. Calcul du nombre de sujets nécessaires</i>	<i>117</i>
<i>II.5.2. Méthode et stratégie d'analyse</i>	<i>117</i>

RESULTATS.....	120
DISCUSSION.....	140
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	163

INTRODUCTION

L'obésité est un problème majeur de santé publique. En 2012 en France, 32.3% des adultes de plus de 18 ans étaient en surpoids ($25 \leq \text{IMC (indice de masse corporelle)} < 30 \text{ kg/m}^2$) et 15.0% étaient obèses ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (1). L'estimation issue de l'Etude Nationale Nutrition Santé (ENNS) se basait sur des données anthropométriques mesurées dans 73 centres d'examen de santé de la sécurité sociale en 2006 et indiquait une prévalence de l'obésité de 16.1% chez les hommes et de 17.6% chez les femmes dans la population 18-74 ans (2). La prévalence de l'obésité augmente continuellement (+1.1 kg/m²/an depuis 1997, soit une augmentation de 76.4% en 15 ans), touchant actuellement autant la femme que l'homme (prévalence de 15.6% vs 15.8% (3)). La prévalence de l'obésité est de 11.1% chez les femmes de 25-34 ans et de 15.5% chez les femmes de 35-44 ans (1), notamment du fait de prise de poids à chaque grossesse sans retour au poids initial en post-partum (3). D'autre part, la prévalence de l'obésité augmente régulièrement avec l'âge, ce qui entraîne un coût sociétal non négligeable puisqu'elle est associée à de multiples complications telles que le diabète, l'hypertension artérielle (HTA) ou les pathologies cardio-vasculaires, les troubles respiratoires ou le cancer (4), les décès par pathologies cardio-vasculaires représentant environ 65% des causes de décès (5).

La prévalence de l'obésité augmentant actuellement chez les femmes jeunes, l'obésité devient de plus en plus fréquente chez les femmes enceintes. D'autre part, la prise de poids au cours de la grossesse est plus souvent excessive dans cette population, notamment lors d'une première grossesse(6). L'Institut de Médecine recommande une prise de poids maximale de à 9 kg chez les femmes obèses, de 11,5 kg chez les femmes en surpoids et de 16 kg chez les femmes ayant un poids normal. Cependant, 59% des femmes obèses et 67% des femmes en surpoids ont une prise de poids excessives au cours de la grossesse, alors que cela ne concerne que 32% des femmes ayant un IMC normal (7). Cette prise de poids excessive au cours de la grossesse est responsable d'une augmentation du risque de macrosomie fœtale (8). Les femmes ayant une prise de poids plus importante pendant la grossesse sont plus susceptibles de développer une obésité en post-partum (9). Linne, *et al.* a montré la moitié des femmes ayant un IMC pré-conceptionnel dans les normes mais qui dépassait les limites de gain de poids conseillées pendant la grossesse se retrouvait en surpoids 15 ans plus tard (10).

Au cours de la grossesse, l'obésité est associée à une augmentation significative des complications, aussi bien chez la femme que chez son enfant. En effet, la grossesse se complique plus fréquemment chez la femme obèse (diabète, HTA gravidique, pré-éclampsie) et l'accouchement est souvent plus

difficile (traumatismes obstétricaux, césariennes) (11). De plus, les femmes enceintes avec une obésité sévère sont souvent confrontées à des dépassements de terme, des césariennes plus fréquentes et des risques d'hémorragies post-partum (12). Lorsque les dépôts graisseux prédominent au niveau abdominal, l'obésité est dite androïde et est plus souvent associée à un déséquilibre des fonctions hormonales neuroendocrines et ovariennes, avec une perturbation des cycles menstruels, pouvant mener à une infertilité.

La surveillance de la grossesse est rendue plus complexe du fait de l'augmentation de l'épaisseur de la paroi abdominale (mauvaise échogénicité, difficultés d'évaluation de la croissance fœtale par la mesure de la hauteur utérine...). Chez l'enfant, le principal risque est celui des anomalies de croissance, avec macrosomie fœtale le plus souvent, mais également parfois un retard de croissance intra-utérin (RCIU), en relation avec les anomalies vasculaires d'un diabète maternel souvent associé. On observe également une augmentation de la mortalité périnatale et des malformations congénitales en cas d'obésité chez la femme (anomalies de fermeture du tube neural, malformations cardiaques...) (13,14). Ces anomalies de croissance sont responsables d'une programmation du métabolisme fœtal en période anténatale ayant des conséquences à court terme (hypoglycémie néonatale) et à long terme (programmation du syndrome métabolique) (15–17). Les mécanismes de cette programmation sont encore mal compris et des études sont encore nécessaires pour les élucider et de tenter de les prévenir.

L'obésité se caractérise par une augmentation de la masse adipeuse. Elle peut s'évaluer de différentes manières. Tout d'abord, par le poids de l'individu. Cette donnée est peu précise car elle ne tient pas compte de la taille de l'individu. C'est pourquoi, en pratique clinique, c'est l'IMC qui est utilisé préférentiellement ($IMC = \text{Poids (kg)} / \text{Taille (m)}^2$), un $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ caractérisant une obésité. Cependant, cette valeur ne nous donne pas d'information concernant la composition corporelle et la distribution du tissu adipeux : il serait donc plus précis d'évaluer le pourcentage de masse grasse, par la mesure des plis cutanés, des tours de taille/hanches, ou grâce à l'utilisation d'une balance impédancemétrique. La mesure de l'obésité abdominale ($\geq 94 \text{ cm}$ de tour de taille chez l'homme / $\geq 80 \text{ cm}$ chez la femme) semble être le moyen le plus prédictif du risque de développer des pathologies cardio-vasculaires. Sa prévalence est largement supérieure à celle de l'obésité globale (41.6 chez les hommes et 48.5% chez les femmes) (3). Le tour de taille dans la

population française augmente continuellement, passant de 85.2 cm en 1997 à 90.5 cm en 2012, soit +5.3 cm en 15 ans (1).

L'obésité est une maladie multifactorielle, qui résulterait en premier lieu d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Dans les pays industrialisés, les populations sont de plus en plus sédentaires, or la sédentarité est un facteur de risque de surpoids et d'obésité, de diabète de type 2 et de pathologies cardiovasculaires et elle serait responsable de 6% des décès en France. Les excès alimentaires correspondent à une augmentation des apports caloriques, qu'ils aient lieu au cours des repas ou en dehors, ainsi qu'à la succession de régimes diététiques trop restrictifs, souvent associés à des épisodes de « craquages ». Les excès alimentaires, associés à l'insuffisance d'activité physique entraînent ainsi un stockage des graisses et à une prise de poids. La génétique jouerait elle aussi un rôle dans l'établissement de l'obésité en créant une susceptibilité. A ce jour, une trentaine de gènes ont été associés à cette pathologie (18), dont le gène FTO (Fat mass and Obesity associated) fut le premier locus identifié (19). Enfin, plus récemment, il a été montré que des altérations du microbiote intestinal étaient responsables d'une augmentation de l'absorption énergétique et donc d'une augmentation du poids corporel (20).

Le tissu adipeux est désormais considéré comme un organe, sécrétant des hormones, les adipokines. Ses cellules, les adipocytes, libèrent dans le sang plusieurs hormones, les adipokines, impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique. Il s'agit notamment de la leptine, de l'adiponectine, de la résistine (21) ou encore de l'apeline. En cas d'obésité, l'augmentation de la masse adipeuse modifie la production de la plupart de ces adipokines et leurs interactions (22). Mais il n'a pas encore été établi si ces modifications sont la cause ou la conséquence de l'obésité.

I. OBESITE ET ADIPOKINES

I.1. Obésité et tissu adipeux

Chez l'humain, il existe 2 types de tissus adipeux (TA), ayant chacun une distribution et des fonctions différentes. Le TA blanc sert surtout au stockage des graisses sous forme de triacylglycérol, pouvant être mobilisé secondairement en cas de besoin énergétique. Il a une importante capacité à s'expandre et sa surcharge est associée à une majoration des risques métaboliques. Le TA blanc mature est caractérisé par une augmentation de l'expression des transporteurs de glucose sensibles à l'insuline (GLUT4) et des enzymes telles que la acide gras synthase et le glycérol-2-phosphate déhydrogénase (23). Le TA blanc participe ainsi aux altérations métaboliques et aux pathologies associées à l'obésité telles que le diabète de type 2. Le TA brun est quant à lui plutôt impliqué dans la thermogénèse, et donc dans la dépense énergétique et dans la régulation du poids corporel (24).

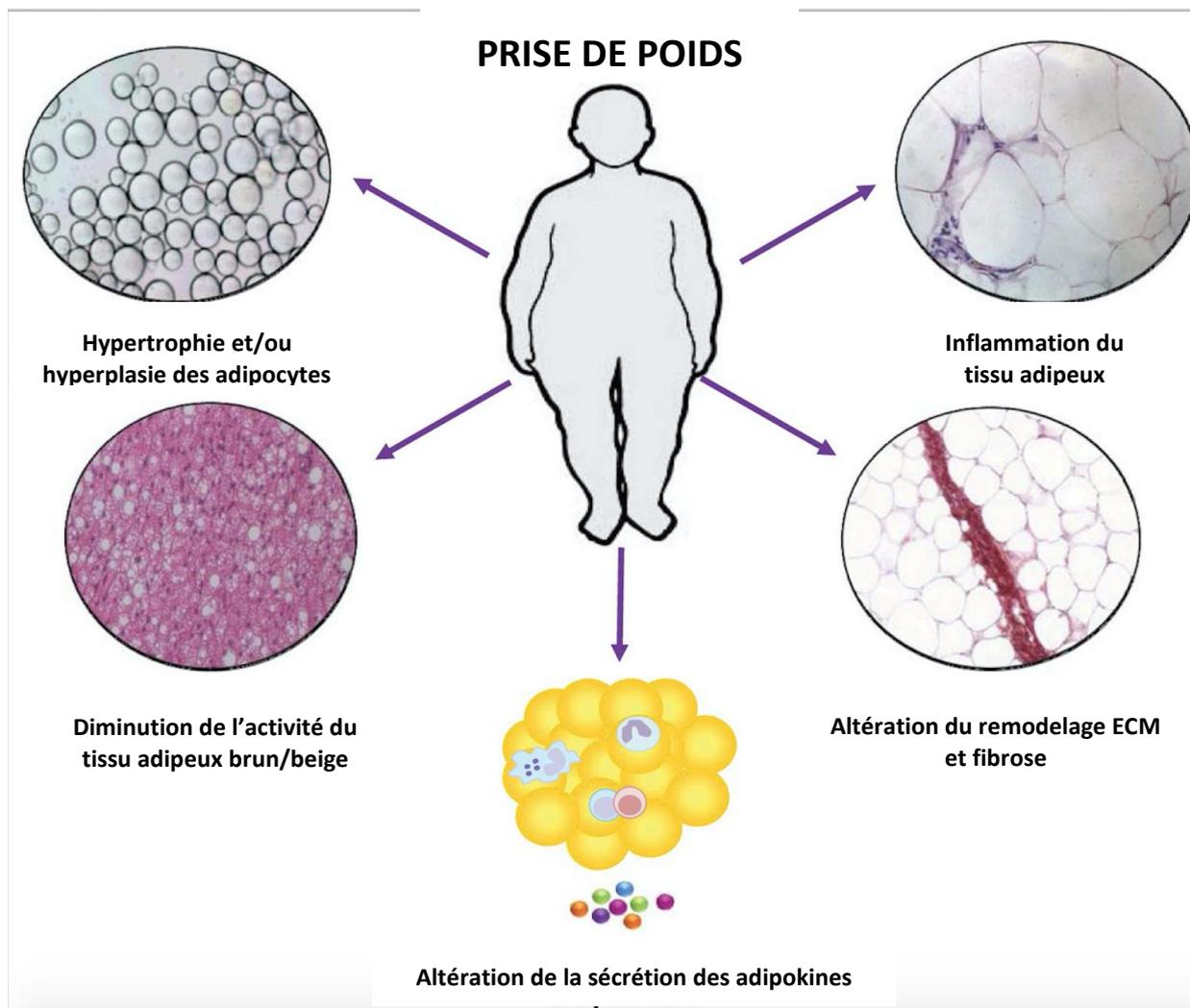
Concernant ses fonctions endocriniennes, le TA n'est pas une glande homogène mais plutôt un groupe de glandes agissant de manière différente. Dans le TA viscéral, la sécrétion d'interleukine-6 (IL-6), du Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), de la résistine et de la visfatine est supérieure à celle dans le TA sous-cutané. Le TA viscéral sécrète des substances directement dans la veine porte qui rejoignent alors le foie et qui ont un impact sur sa fonction, la sécrétion des cytokines augmentant la concentration de la protéine C réactive (CRP) ce qui contribue à la stéatose hépatique (25).

Le TA sous-cutané présente des concentrations de leptine et d'adiponectine supérieures à celles du TA viscéral (21). Il sécrète de la leptine et de l'adiponectine dans la circulation systémique (26,27).

Les recherches sur la fonction de sécrétion du TA blanc débutent en 1994 avec la découverte de la leptine, hormone produite par les adipocytes matures. Depuis, plusieurs autres adipokines ont été découvertes, et leurs fonctions et interactions commencent à se préciser.

En cas d'obésité, l'augmentation de la masse adipeuse est responsable d'une modification de la production de la plupart de des cytokines et des adipokines, ainsi que de leurs interactions (22,28). La compréhension des phénomènes anti- et pro-inflammatoires, des adipokines et de l'interaction de ces différents éléments au niveau du tissu adipeux a révolutionné la caractérisation des mécanismes responsables de l'obésité (Figure 1).

Figure 1 : Altérations du tissu adipeux blanc, brun et beige impliqué dans le développement de l'obésité et de ses comorbidités, d'après Rodriguez, et al. (29).



I.2. ADIPOKINES

I.2.1. LEPTINE

La leptine est une hormone maintenant bien connue. Elle a été identifiée en 1994, puis synthétisée un an plus tard. Il s'agit d'une protéine de 16.7 kDa, codée par le gène OB, situé chez l'Homme sur le chromosome 7. Plusieurs récepteurs ont été identifiés, Ob Ra-f type b étant le plus étudié chez l'Homme.

Elle est souvent appelée hormone de la satiété, puisqu'elle régule la prise alimentaire, la dépense

énergétique, et permet de maintenir le poids corporel. L'action de la leptine est essentielle pour la régulation du métabolisme énergétique. Elle a une fonction de stockage et est également impliquée dans la mobilisation des lipides à partir de différents dépôts graisseux et pourrait être liée à la protection de certains tissus contre la lipotoxicité. Il s'agit d'une hormone anorexigène, qui favorise le sentiment de satiété en rejoignant l'hypothalamus au niveau de l'alpha-msh et du neuropeptide Y, induisant la sécrétion de peptides anorexigènes. Elle favorise également l'absorption intestinale de protéines au détriment des lipides.

La leptine est produite et sécrétée par les cellules du tissu adipeux blanc et dont la fonction principale est d'établir un signal entre le tissu adipeux et le centre de satiété cérébral, exerçant un rétrocontrôle négatif sur celui-ci. Sa biosynthèse et sa sécrétion dépendent de la masse corporelle et reflète le stock de ressources énergétiques de l'organisme. Les principaux facteurs ayant un impact sur sa sécrétion sont la taille des adipocytes et la masse du tissu adipeux (25). Chez l'humain, la sécrétion de leptine suit un rythme nyctéméral (30).

En cas d'obésité, la sécrétion de leptine augmente, ce qui induit une lipolyse, inhibe la lipogénèse et augmente la sensibilité à l'insuline. Les sujets obèses présentent une augmentation des taux plasmatiques de leptine (31), associée à une leptino-résistance et une diminution de son effet anorexigène. Ainsi, il a été montré qu'une injection de leptine exogène ne réduisait pas la masse corporelle (32,33). Une mutation du récepteur de la leptine (gène DB) a été identifiée et est responsable d'une obésité majeure chez l'individu qui en est atteint. Les sujets perdant du poids après régime hypocalorique diminuent leurs taux plasmatiques de leptine, ce qui est associé temporairement à une diminution réversible de l'activité thyroïdienne, du tonus sympathique et une diminution de la dépense énergétique de base. Chez le sujet déficient en leptine, le traitement par de la leptine recombinante réduit la prise alimentaire et le poids corporel.

L'expression et la sécrétion de leptine est contrôlée par différentes hormones et facteurs. Ainsi, elle semble être stimulée par l'insuline, les glucocorticoïdes, le TNF- α , les oestrogènes et le C/EBPA. En revanche, elle est diminuée par les androgènes, l'activité β 3-adrénergique, les acides gras libres, l'hormone de croissance et les agonistes de PPAR- γ (23).

Une plus faible quantité de leptine est également sécrétée par le placenta, le cerveau, l'estomac, la glande mammaire et le foie chez les oiseaux (25).

I.2.2. ADIPONECTINE

L'adiponectine a été découverte dans les années 1990. Il s'agit d'une adipocytokine est produite par le tissu adipeux et impliquée, entre autres, dans la régulation du métabolisme énergétique.

Ce polypeptide de 247 acides aminés a une masse de 33 kDa. Son gène situé sur le chromosome 3 chez l'Humain. La région du chromosome 3 (3q27) comportant le gène de l'adiponectine contient également un locus de susceptibilité pour le diabète de type 2 et pour le syndrome métabolique, faisant suspecter que des mutations au niveau de son gène pourraient être impliquées dans certains désordres métaboliques (34). L'adiponectine est produite par le tissu adipeux. Sa synthèse est augmentée par l'insuline et l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) et diminuée par l'IL-6, les glucocorticoïdes et le TNF- α (25,35).

Les taux d'adiponectine plasmatiques sont diminués en cas d'obésité, de syndrome métabolique et de diabète de type 2 (36). En cas de perte de poids, on observe une augmentation des concentrations de cette hormone. Cette relation est à l'inverse des autres adipokines, du fait probablement d'une boucle de rétrocontrôle négatif permettant le contrôle de son expression et de sa sécrétion. Elle a un rôle insulinosensibilisant, via la diminution du taux de triglycérides tissulaires, l'augmentation de la combustion des acides gras libres par activation du peroxysome proliferator activated receptor α (PPAR α) et l'activation de l'adénosine monophosphate kinase (AMP-kinase) stimulant la β -oxydation, et un rôle antiathérosclérosant via l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et la suppression de la captation du LDL-cholestérol oxydé par les macrophages (37).

I.2.3. RESISTINE

Il s'agit d'une adipokine découverte en 2001. Ce peptide de 12 kDa est composée de 114 acides aminés chez l'Homme et son gène est situé sur le chromosome 19. Elle est produite par les adipocytes et par les macrophages. Son rôle est de maintenir la glycémie à jeun et les conséquences de son action sont la constitution d'un excès de tissu adipeux blanc (38). Elle active la néoglucogénèse et joue un rôle dans l'insulino-résistance. En effet, l'injection de résistine recombinante chez la souris de poids normal est responsable d'une altération de la tolérance au glucose et du développement d'une insulino-résistance, alors que chez la souris obèse, l'injection d'un anticorps anti-résistine entraîne une diminution de la glycémie et une augmentation de la sensibilité à l'insuline (38).

Chez l'Homme, elle est également un marqueur de l'inflammation dont l'expression de son gène est régulée par des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF α , l'inhibiteur de l'activateur plasminogène 1 (PAI-1) et l'IL6 (39). Elle serait prédictive du risque de athérosclérose au niveau des artères coronaires, indépendamment de la CRP.

1.2.4. VISFATINE

La visfatine a été caractérisée en 1994, initialement surtout pour ses fonctions pro-inflammatoires. Fukurama, *et al.* a découvert en 2005 qu'elle était également sécrétée par le tissu adipeux viscéral et sous-cutané en 2005, ce qui fait d'elle une adipokine. Sa concentration plasmatique est très corrélée à la quantité de masse adipeuse viscérale, et dans une moindre mesure à celle du tissu adipeux sous-cutané.

Elle présente des effets insulino-mimétiques exercés par une action directe sur le récepteur de l'insuline, en se fixant à celui-ci sur un site distinct de l'insuline. Elle augmente la sensibilité à l'insuline et l'absorption de glucose par les cellules musculaires et les adipocytes. Elle est donc impliquée dans le contrôle de la glycémie, mais avec une contribution plus faible que l'insuline, sa concentration plasmatique étant 10 fois moins importante que celle de l'insuline à jeun et 30 fois moindre à l'état nourri . Ces propriétés le rendent intéressante comme agent thérapeutique potentiel.

Elle joue également un important rôle pro-inflammatoire en activant les leucocytes et les cytokines, et elle augmente l'adiposité (25).

1.2.5. APELINE

Les taux d'apeline plasmatiques varient également de manière très importante selon l'importance du tissu adipeux du sujet et elle augmenterait probablement l'insulinosensibilité des tissus. La faim inhibe sa sécrétion et, telle que l'insuline, sa concentration augmente après un repas.

Le système apelinergique va être développé dans le prochain chapitre.

II. LE SYSTEME APELINERGIQUE

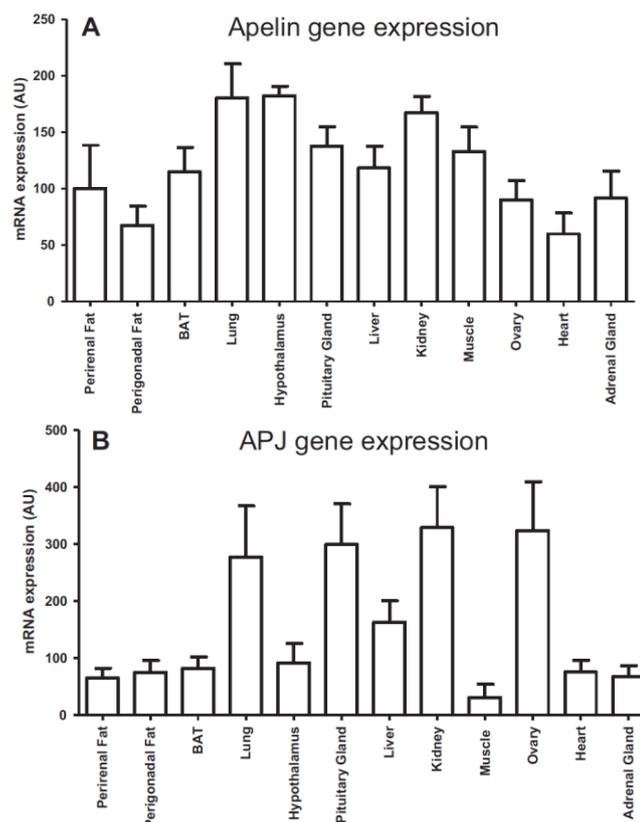
II.1. LE RECEPTEUR APJ

Le récepteur de l'apeline, nommé APJ, est un récepteur membranaire couplé à une protéine G découvert en 1993 par O'Dowd, *et al.* (40), et présente une homologie de séquence avec le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1). APJ ne lie pas l'AT2 et est resté orphelin jusqu'à la découverte de l'apeline en 1998. Un premier ligand a été découvert en 1998, l'apeline, et plus récemment a été découvert un second ligand d'APJ, Elabela.

II.1.2. Localisation

Chez l'Homme, la séquence codante d'APJ est située sur le chromosome 11 (40). APJ est constitué de 380 acides aminés et est très conservé au sein des espèces. Les ARNm d'Apeline et d'APJ sont exprimés dans le cœur, les vaisseaux, les cellules endothéliales, les poumons, plusieurs régions du système nerveux central, les adipocytes (tissu adipeux blanc et dans une moindre mesure dans le tissu adipeux brun), le placenta, la glande mammaire et le tractus gastro-intestinal (41–43) (Figures 2A et 3B). En fonction du type de cellule étudié, l'activation de l'APJ entraîne l'activation de plusieurs effecteurs intracellulaires tels que les Kinases Régulées par Signal Extracellulaire (ERK), la protéine kinase B (PKB ou Akt) et la kinase p70S6, mais aussi une inhibition de la production d'AMPc (44,45).

Figures 2A-B : Expression de l'ARN messenger de l'apeline (A) et d'APJ (B) dans les différents tissus, chez la souris mâle (46)



II.1.3. Action paracrine/autocrine/endocrine

L'apeline et son récepteur APJ sont souvent co-localisés dans les tissus (47), suggérant que l'apeline exerce ses effets en partie par le biais d'un mode d'action paracrine ou autocrine. L'apeline est également abondamment détectée dans le plasma, ce qui indique qu'elle possède une fonction endocrine (47,48).

Le système apelinergique est ubiquitaire. Ses fonctions et modes d'action sont très variées et dépendent du tissu dans lequel ils sont exprimés (44).

II.1.4. Internalisation

Lorsque l'apeline se fixe sur son récepteur, celui-ci est internalisé et va entraîner l'activation des voies de signalisation, le recyclage à la membrane ou la dégradation de ce complexe (49). Cette action diffère selon l'isoforme d'apeline interagissant avec le récepteur APJ.

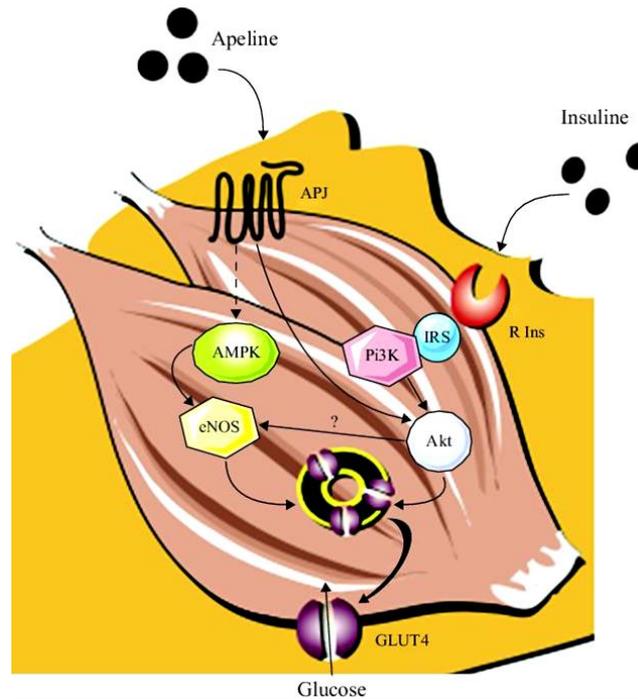
Le récepteur APJ est, à l'état basal, situé sur la membrane cellulaire. En présence d'apeline-13, APJ est phosphorylé et forme un complexe rapidement inclus dans des vésicules intracellulaires. Lorsque le complexe est associé à la protéine Rab4, il est recyclé à la membrane, et lorsqu'il s'agit la protéine Rab7, il est acheminé vers les lysosomes pour y être dégradé (50).

II.1.5. Les voies de signalisation

Sur des cellules CHO, l'ajout d'apeline-13 ou d'apeline-36 entraîne l'acidification du milieu, illustrant l'activation des cellules exprimant le récepteur APJ.

Dray et al. ont démontré l'implication in vivo de la voie dépendante du NO (eNOS) dans l'augmentation de l'utilisation du glucose dans les muscles squelettiques régulée par l'apeline (51). Cependant, Yue et al. en 2009 ont montré l'absence de modification de la captation cellulaire du glucose après ajout de L-NAME (inhibiteur des NOS) dans une culture de cellules musculaires squelettiques(52) (Figure 3). L'apeline augmente l'utilisation du glucose et la sensibilité à l'insuline via une phosphorylation d'Akt, en partie modulée par les protéines Gi et une voie dépendante de l'AMPK (protéine kinase activée par l'AMP) (52). APJ, en présence d'apeline, activerait la phosphorylation de la protéine Akt en Ser473 et de la protéine eNOS en Ser1177, puisque cette activation n'est pas retrouvée chez les souris Knocked-Out (KO) pour le récepteur APJ (53,54). L'AMPK passerait par une phosphorylation de l'IRS-1 (Insulin receptor substrate-1) et impliquerait la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (55,56).

Figure 3 : Voies de signalisation impliquées dans l'utilisation du glucose par le muscle induite par l'apeline (56).



La régulation de l'AMPK par l'apeline permettrait d'augmenter la captation du glucose par les muscles squelettiques, de limiter la sécrétion d'insuline par le pancréas, de réguler la lipolyse et la lipogénèse et de modifier le comportement alimentaire (57).

Dray, *et al.* a montré que l'injection intra-veineuse d'apeline permet de diminuer la glycémie en augmentant l'utilisation du glucose dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux via la voie dépendante de la NO Synthase endothéliale, via l'AMPK, et dans le muscle soléaire via Akt (51). Chez les souris obèses et insulino-résistantes, l'apeline restaure la tolérance glucidique et augmente l'utilisation de glucose. Elle aurait donc un rôle protecteur pour l'organisme (41).

II.2. L'APELINE

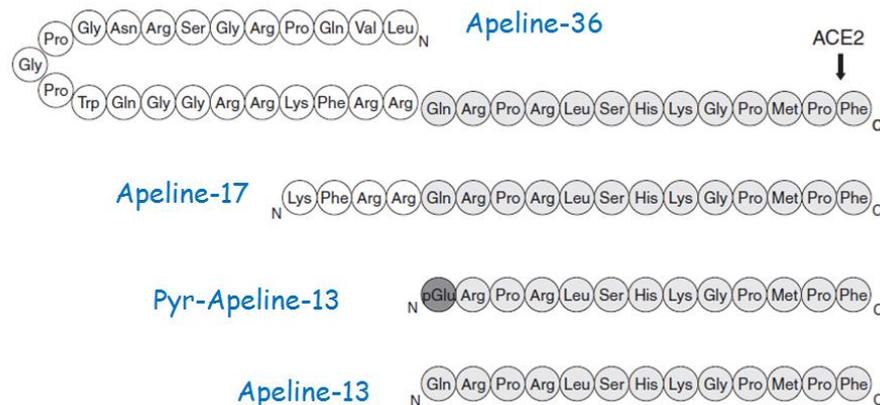
II.2.1. Peptide Apeline

Le récepteur APJ est resté orphelin jusqu'en 1998 où Tatemoto, *et al.* a découvert son ligand endogène, l'apeline, isolé à partir d'extraits d'estomacs bovins (58).

II.2.2. Biosynthèse et dégradation

Le gène de l'apeline est localisé sur le chromosome 11. L'apeline est synthétisée sous la forme d'un pré-pro-peptide de 77 acides aminés. Les modifications post-traductionnelles de la pré-pro-apeline génèrent plusieurs isoformes de différentes longueurs, telles que l'apeline-36, l'apeline-17, l'apeline-16, l'apeline-13 et l'apeline-12, l'apeline-13 étant le fragment le plus actif (59,60). De plus, l'apeline-13 peut subir des modifications post-traductionnelles au niveau d'un acide aminé glutamate de son extrémité N-terminale, générant de l'apeline-13 pyroglutamate avec un pyroglutamate en position 1 ((Pyr¹)apelin-13), qui est plus résistante à la dégradation par les exopeptidases (61) et qui est donc la forme la plus conservée au sein des espèces (62,63) (Figure 4). La (Pyr¹)apelin-13 est l'isoforme prédominante détectée dans le plasma et le cœur humain (64).

Figure 4 : Séquences en acides aminés des différentes isoformes de l'apeline (d'après Pitkin et al. (63)). La flèche noire indique le site de clivage de l'ACE2. N : Partie N-terminale, C : Partie C-terminale. L'apeline-12, représentée sur cette figure, est aussi une isoforme active de l'apeline (65)).



L'ensemble des isoformes de l'apeline peuvent lier et activer APJ car seuls les 12 derniers acides aminés au niveau de sa partie C-terminale sont essentiels à l'activité biologique de l'apeline. A l'heure actuelle, le rôle des différentes isoformes d'apeline reste incertain, mais semble indiquer un rôle spécifique de certaines isoformes dans les tissus. L'affinité d'apeline-13 pour APJ est forte, mais le complexe se dissocie rapidement (66), alors que le complexe apeline-36-APJ persiste plus longtemps (50). L'activité biologique de l'apeline-13 est 8 fois plus importante que celle de l'apeline-17 et 60 fois plus élevée que l'apeline-36, ce qui laisse supposer que ce sont principalement les formes courtes qui se fixent sur les récepteurs pour engendrer des réponses biologiques (67). L'apeline-17 agit également sur APJ, avec un pouvoir plus important que celui de la Pyr-apeline 13 (68).

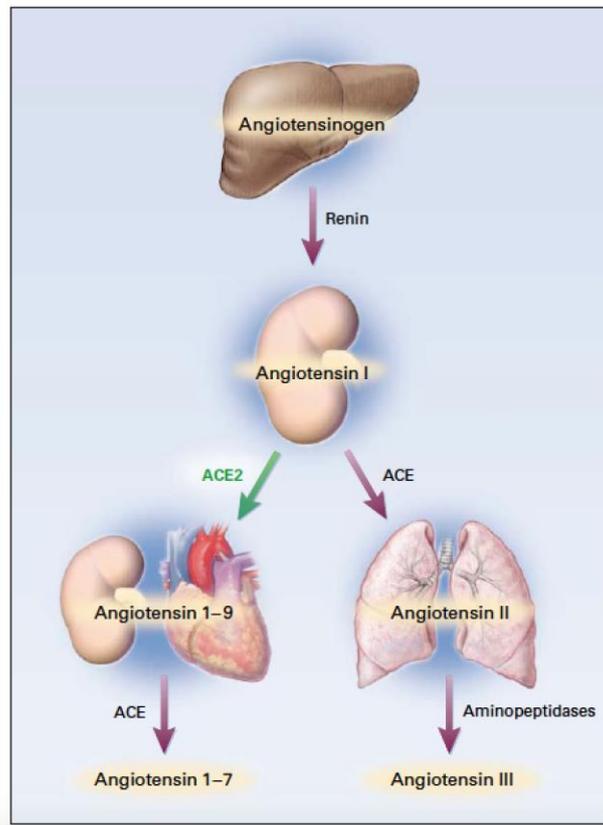
La (Pyr¹)apeline-13 est l'isoforme la plus abondante dans le plasma de rat, alors que l'apeline-17 et l'apeline-36 sont présentes à un taux inférieur (69). Dans le plasma humain, les isoformes moléculaires les plus répandues sont l'apeline-13, la (Pyr¹)apeline-13 et l'apeline-17, mais l'apeline-36 est également détectée à faible concentration (70). Nous ne savons pas à l'heure actuelle quels tissus contribuent le plus aux taux des isoformes de l'apeline circulante et aussi si la proportion de chaque forme d'apeline est régulée. Il est admis que l'apeline est libérée dans le plasma par ses principaux organes producteurs tels que le système cardio-vasculaire (cœur, vaisseaux, cellules endothéliales), le poumon, le sein allaitant, le tractus gastro-intestinal et le tissu adipeux.

L'apeline et APJ sont exprimés chez un large éventail d'eucaryotes, y compris les humains et les rongeurs (47). Les différentes isoformes d'APJ sont très conservées selon les espèces, dont les 23 derniers résidus en partie C-terminale qui sont identiques chez l'ensemble des Mammifères (63,71).

La séquence en acides aminés de la pré-pro-apeline comprend de nombreuses paires d'acides aminés basiques (Arginine-Arginine ou Arginine-Lysine), laissant supposer une action de clivage par les endopeptidases à l'origine des différents peptides cités précédemment.

De manière assez étonnante, l'apeline-13 et l'apeline-36 sont des substrats d'ACE2 (angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase-2) qui enlève une phénylalanine au niveau de leur partie C-terminale, aboutissant à des métabolites clivés inactifs (72). Pour d'autres auteurs, ce clivage n'entraînerait pas de diminution d'activité de l'apeline ou d'internalisation du récepteur APJ, suggérant que cette modification post-traductionnelle entraînerait uniquement un changement de conformation du peptide clivé (68).

ACE2 est une enzyme également impliquée dans le système rénine-angiotensine où elle convertit l'angiotensine 1 (AT1) en angiotensine (1-9), formée par 9 acides aminés. En parallèle, ACE1 convertit AT1 en AT2 (Figure 5). L'enzyme de conversion 2 est codée par le gène ACE2, porté par le chromosome X humain. Il s'agit d'une métalloprotéase présente essentiellement dans les cellules endothéliales vasculaires du cœur, des reins et des testicules (73). AT(1-9) n'a, contrairement à AT2, aucun effet sur les vaisseaux sanguins. Il convertit AT2 en une version ayant 7 acides aminés, AT(1-7), qui est vasodilatateur (74). ACE2 a donc un effet antagoniste à ACE1 en étant responsable d'une clairance de l'AT2.

Figure 5 : Schéma simplifié du système rénine-angiotensine (74)

II.2.3. Les différentes fonctions du système apelinergique dans l'organisme

Le système apelinergique est impliqué dans de nombreux processus homéostatiques tels que la régulation cardiovasculaire, l'angiogenèse, l'homéostasie des fluides, le métabolisme glucidique et énergétique, la réponse immunitaire, la réponse au stress et les processus digestifs (47,75,76).

Des taux élevés d'apeline plasmatique ont été détectés dans diverses pathologies telles que les maladies cardiaques, l'athérosclérose, l'angiogenèse tumorale, le diabète ou l'obésité (77–79). L'administration d'apeline a montré des effets bénéfiques sur les dysfonctionnements cardiovasculaires et le métabolisme du gluco-lipidique (47). Le système apelinergique aurait donc des propriétés cardio-protectrices, anti-diabétiques et anti-obésité.

Mais le système apelinergique est encore mal connu et ses rôles sont extrêmement divers. Ainsi, au niveau cardiovasculaire, l'apeline a un rôle angiogénique, un effet hypotenseur important ainsi qu'un effet inotrope positif. Ces actions ont été étudiées de façon importante notamment dans le cadre des diagnostics et traitements des infarctus du myocarde ou des cardiomyopathies. Ce système intervient également dans l'homéostasie des liquides, dans l'ingestion de nourriture, dans la

prolifération cellulaire et dans des actions endocrines telles que la régulation de la sécrétion d'ACTH (48,80,81). L'apeline ne pouvant pas passer la barrière hémato-encéphalique, les récepteurs centraux et périphériques de l'apeline doivent donc être considérés comme des systèmes séparés (64).

II.2.3.1. Action centrale

Les neurones apelinergiques sont présents en grande quantité dans l'hypothalamus, au niveau des noyaux paraventriculaires (PVN) et supra-optiques (SON) qui sont des zones qui interviennent dans les processus endocriniens et dans l'homéostasie énergétique (82). Des neurones sécrétant l'apeline ont aussi été retrouvés dans la couche interne de l'éminence médiane et dans l'hypophyse postérieure puisque les neurones apelinergiques sont co-localisés avec les neurones magnocellulaires à vasopressine et ocytocine qui se projettent du PVN et du SON dans l'hypophyse postérieure. Par ailleurs, certaines zones cérébrales de régulation de la prise hydrique expriment elles aussi l'apeline et son récepteur (lame terminale, le long du troisième ventricule) (43,83). L'expression de l'APJ dans l'hypothalamus est très importante dans le PVN, le SON, la glande pinéale et les lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse (71). Au niveau central, l'apeline intervient dans la régulation de l'équilibre hydrique et dans celle de la prise alimentaire.

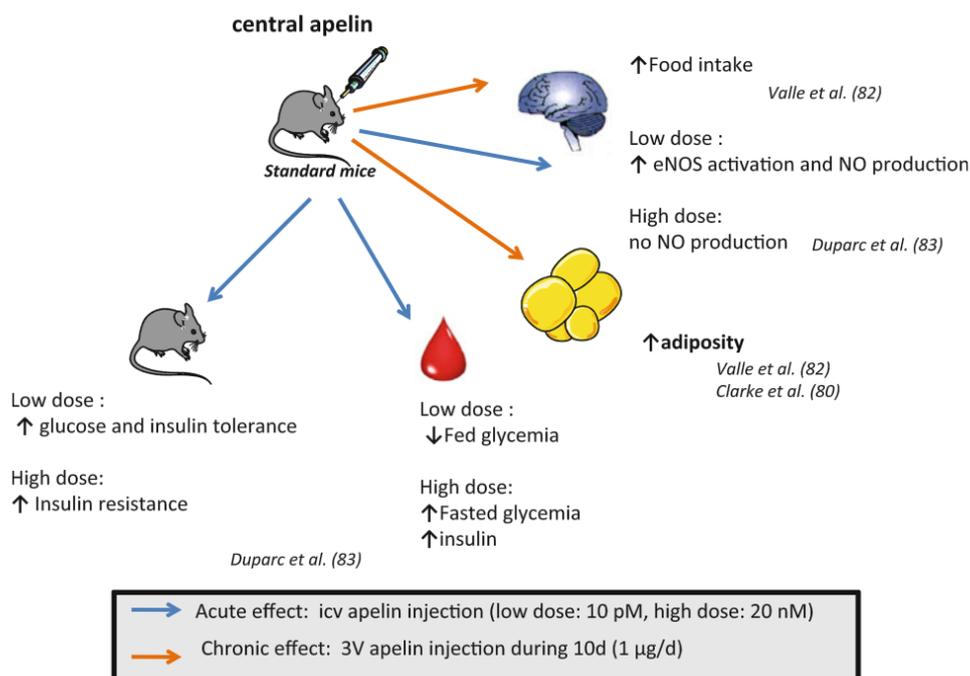
a. Modulation de l'équilibre hydrique

La vasopressine est un peptide vasoconstricteur et antidiurétique dont la sécrétion par les neurones magnocellulaires du PVN et du SON dépend des conditions de volémie et d'osmolalité plasmatique de l'organisme (84). Les neurones vasopressinergiques sont activés en cas de déshydratation dans le but d'augmenter la prise hydrique et de limiter la diurèse via la sécrétion et la libération de la vasopressine dans le sang (84). L'apeline, bien que sécrétée par les mêmes neurones semble avoir un effet opposé ; en effet, Reaux, *et al.* a montré que l'injection d'apeline (apeline-13 ou -17) au niveau central diminuait significativement la prise hydrique chez des rats déshydratés pendant 24 heures (82). Ces données révèlent une action de l'apeline dans le maintien d'un équilibre hydrique plutôt en faveur de la diurèse. Ces résultats ont été confirmés par ceux d'Azizi, *et al.* montrant que dans le plasma, les taux d'apeline étaient augmentés en cas de surcharge en eau et diminuée en cas d'osmolarité élevée (70). Une action directe de l'apeline sur le rein n'est pas exclue puisque l'apeline et son récepteur sont tous les deux exprimés dans les tissus rénaux chez les rongeurs et chez l'Homme au niveau des tubules rénaux (81).

b. Régulation de la prise alimentaire

En ce qui concerne la régulation de la prise alimentaire par le système apelinergique, les données de la littérature sont plutôt contradictoires. L'injection pendant 10 jours d'apeline-13 en intra-cérébro-ventriculaire (ICV) (1 µg/jour) chez la souris pendant 10 jours entraîne une augmentation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et la température corporelle avec prise de poids, l'augmentation de l'activité n'étant pas suffisante pour compenser l'hyperphagie (85) (Figure 6). Les effets de l'apeline sur la prise alimentaire dépendraient du statut nutritionnel des animaux. Chez le rat, l'administration en ICV d'apeline-13 diminue la prise alimentaire, que les rats soient nourris ou non (86). La prise alimentaire serait diminuée si l'injection d'apeline était réalisée avant la phase nocturne alors qu'elle serait augmentée, même chez des rats nourris, lorsqu'elle était réalisée en journée (65). Pourtant, en 2011, Reaux-Le Goazigo, *et al.* a montré que les neurones à POMC (Proopiomélanocortine, précurseur de l' α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), un peptide anorexigène) présentaient une colocalisation avec les neurones apelinergiques et que les neurones à POMC expriment le récepteur APJ (87). En cas d'obésité, l'augmentation de la concentration d'apeline dans l'hypothalamus permettrait de produire de l' α -MSH et donc de réduire la prise alimentaire dans le but de limiter la prise de poids. L'hyperapelinémie entraînerait une désensibilisation du récepteur APJ hypothalamique, ce qui pourrait expliquer l'obésité chez des souris soumises à un régime hypercalorique (41).

Figure 6 : Effets métaboliques de l'injection aiguë ou chronique au niveau central chez la souris de poids normal. L'apeline était administrée par injection intra-cérébro-ventriculaire (ICV) au cours du traitement aigu et par injections dans le 3ème ventricule (3V) pour le traitement chronique (41).



II.2.3.2. Actions périphériques

a. Cardio-vasculaire

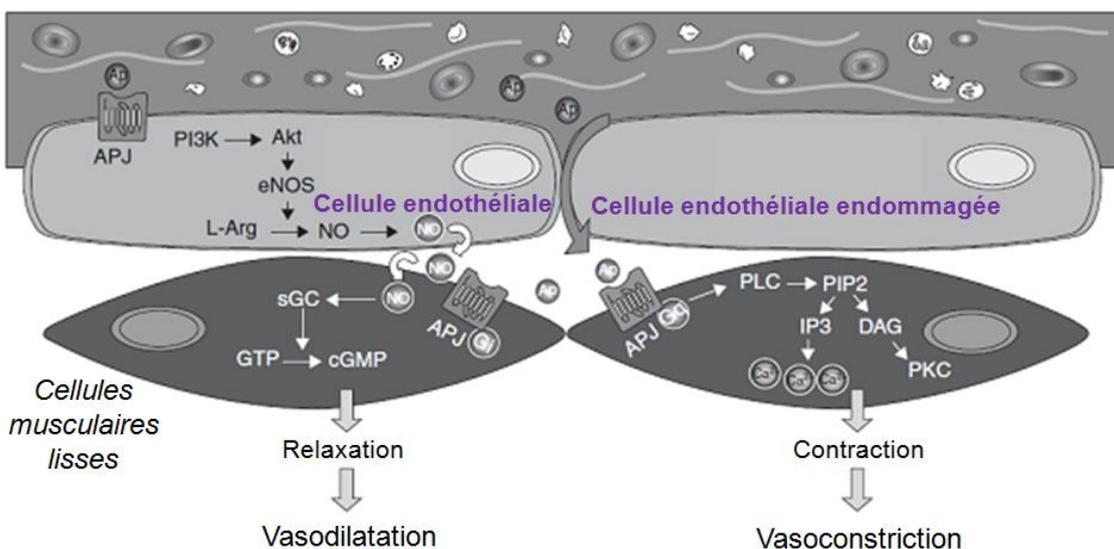
Au niveau cardio-vasculaire, l'apeline a un rôle vasodilatateur, inotrope positif et pro-angiogénique.

1. Vasodilatation

Le récepteur APJ est présent sur les cellules endothéliales (88). L'expression importante de l'apeline dans ces cellules peut expliquer les taux d'expression très élevés retrouvés dans les tissus hautement vascularisés (cœur, reins, poumons...).

Chez le rongeur, l'apeline exogène entraîne une diminution de la pression artérielle, ce qui laisse supposer un pouvoir vasodilatateur de l'apeline (89). Chez l'Homme, Il a été montré que la (Pyr¹)-apeline-13 et l'apeline-36 entraînaient une vasodilatation dans le bras perfusé, avec un effet dose-dépendant. Cet effet était plus durable pour l'apeline-36 que pour la (Pyr¹)-apeline-13 (persistance de l'augmentation du débit sanguin jusqu'à 42 minutes après arrêt de la perfusion, *versus* une phase plateau atteinte après 15 minutes). Cette vasodilatation est inhibée par l'ajout de L-NMMA (inhibiteur des NO synthases), ce qui implique que l'effet vasodilatateur de l'apeline est dépendant de la NO synthase endothéliale. Lorsque l'apeline se fixe sur le récepteur APJ des cellules endothéliales, cela permet une vasodilatation NO-dépendante. En revanche, si l'apeline active le récepteur APJ présent sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux (en cas d'endothélium lésé par exemple), cela entraîne une vasoconstriction (Figure 7) (90).

Figure 7 : Voies de signalisation responsables de la vasodilatation/vasoconstriction en réponse à l'apeline (85)

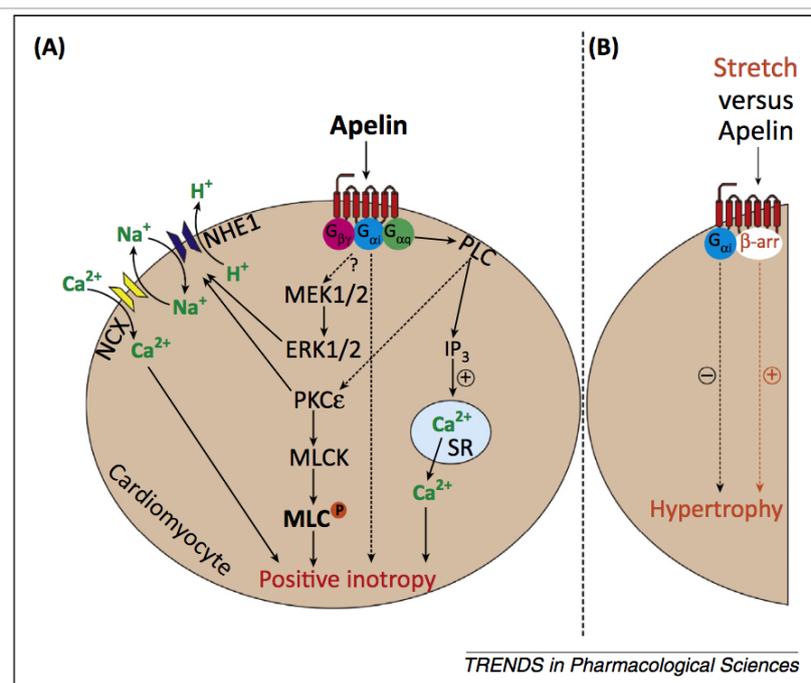


La modulation du tonus vasculaire n'interviendrait pas uniquement par une vasodilatation NO-dépendante puisque, même si l'apeline diminue le tonus vasculaire de 25 à 50 %, elle est aussi capable d'inhiber la vasoconstriction induite par l'AT2 (90). Cette action est aussi présente chez des souris db/db qui répondent à une exposition à l'AT2 *in vitro* par une vasoconstriction des anneaux aortiques très importante mais qu'un traitement par l'apeline peut amoindrir (91). Récemment, il a été démontré qu'APJ était capable de former des hétérodimères avec le récepteur de l'AT2 de type 1 et de l'inactiver (92). Il semble donc qu'il existe un lien fonctionnel important entre le système apelinergique (vasodilatateur) et le système rénine-angiotensine (vasoconstricteur) dans le contrôle de la vasomotricité.

2. Contractilité cardiaque

L'apeline est présente dans le myocarde, dans l'endothélium du cœur, des gros vaisseaux, des veines et des artères (85). En 2002 que Szokodi, *et al.* a montré que l'injection d'apeline-16 entraînait une augmentation de la contractilité cardiaque. Les concentrations utilisées étaient très faibles (0,01 à 10 nM), laissant suggérer que l'apeline puisse être un puissant agent inotrope positif (64,93). De plus, l'apeline augmente la contractilité cardiaque indépendamment des récepteurs à l'AT2 ou de l'endothéline-1, ou encore des récepteurs α et β -adrénergiques et de la eNOS (90) (Figure 8).

Figure 8 : Mécanismes proposés pour l'effet inotrope positif induit par l'apeline (64)



Un exercice physique régulier provoque une augmentation des concentrations d'apeline plasmatique, cardiaque et dans les vaisseaux chez des rats spontanément hypertendus (rats SHR). L'apeline permettrait ainsi de limiter l'HTA chez les animaux en condition d'activité physique marquée. Elle aurait aussi un rôle cardio-protecteur en diminuant l'apoptose via la voie PI3K/Akt dans le myocarde et en réduisant la fibrose cardiaque induite par l'AT2 (90). Enfin, une diminution de l'apelinémie serait retrouvée chez les patients atteints d'une insuffisance cardiaque (42,94), suggérant que l'apelinémie puisse être, chez l'Homme, un marqueur de pathologie cardiaque (89).

3. Angiogénèse

L'apeline est connue pour être un facteur angiogénique dans les cellules de rétine (95), et APJ a été découvert dans les cellules précurseurs de la vascularisation embryonnaire (96). L'apeline est également connue pour être un facteur mitogène et de migration des cellules endothéliales (90).

En 2007, Malamitsi-Puchner, *et al.* a comparé les concentrations en apeline plasmatique chez 40 couples mère/enfant au moment de l'accouchement et jusqu'à 4 jours après l'accouchement. L'apelinémie maternelle et fœtale à la naissance (prélèvement de sang de cordon ombilical), au 1^{er} jour et au 4^{ème} jours chez le nouveau-né montraient des variations importantes. L'apelinémie fœtale était plus élevée que l'apelinémie maternelle au moment de la naissance, ce qui laisse présager d'une production par le placenta qui pourrait sécréter dans les compartiments maternels et fœtaux cette hormone pendant la grossesse (97). Etant donné que l'apeline est connue pour agir sur la croissance des vaisseaux, et sur la prolifération des cellules endothéliales et qu'elle est fortement exprimée dans les vaisseaux embryonnaires (88), la forte concentration plasmatique d'apeline retrouvée chez les fœtus pourrait être le reflet d'une production accrue pour aboutir à une angiogénèse *in utero*. La diminution de l'apelinémie à J1 serait corrélée à l'élimination du placenta (97). Enfin, l'augmentation à J4 de l'apelinémie observée serait corrélée à une augmentation de l'activité angiogénique *ex utero* d'après Malamitsi-Puchner, *et al.* (97).

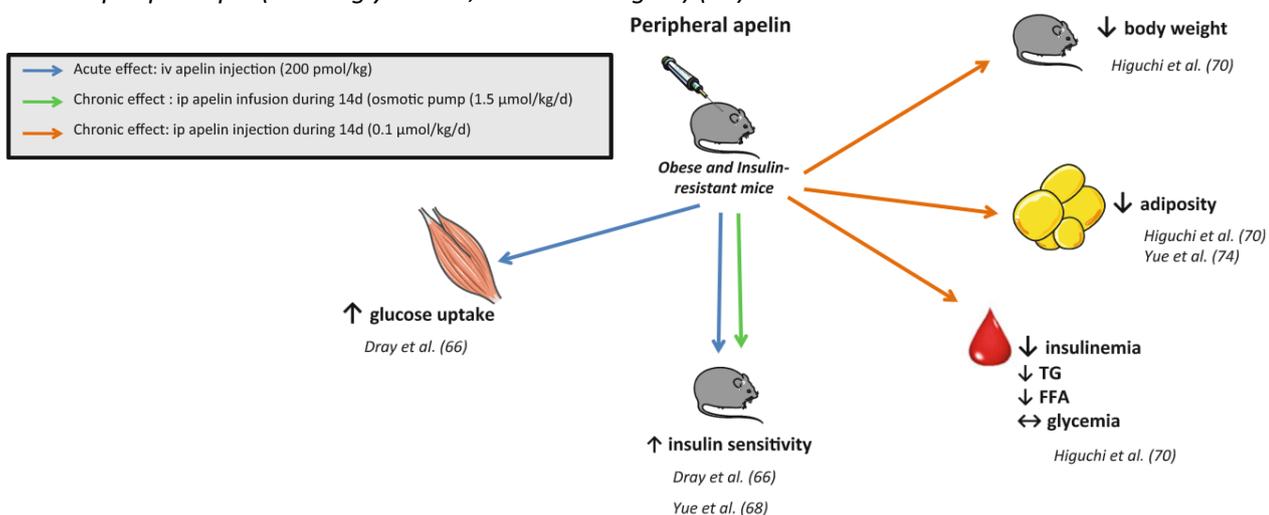
b. Régulation du métabolisme énergétique

L'apeline interviendrait dans la régulation du métabolisme énergétique. Ainsi, elle varie en fonction du statut nutritionnel de l'individu (46,48) : elle diminue en cas de jeûne puis augmente en cas de réalimentation, et ce parallèlement aux taux plasmatiques d'insuline (48).

Le récepteur APJ est exprimé par les cellules β -pancréatiques et l'apeline est capable de moduler la

sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation des taux circulants de glucose (98). Une perfusion d'apeline améliore l'utilisation du glucose en ciblant spécifiquement les tissus musculaires squelettiques et adipeux (51). Au niveau du système nerveux central, l'apeline entraîne une diminution de la glycémie chez des souris nourries, par une voie dépendante du NO (99). Le rôle de l'apeline dans l'homéostasie glucidique a été également confirmé par le phénotype des souris déficientes pour l'apeline, dont la perte de la sensibilité à l'insuline est exacerbée lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses et en sucrose (52). Enfin, en 2013, Dray, *et al.* a mis en évidence *in vivo* et *in vitro*, chez la souris adulte, qu'une administration orale de glucose induit une sécrétion d'apeline endogène dans la lumière du petit intestin. Cette production est capable de moduler l'expression entérocytaire de transporteurs aux monosaccharides de types SGLT1 (Sodium-glucose cotransporter 1) et GLUT2 (transporteur de glucose 2) afin d'augmenter le transport du glucose alimentaire vers la veine porte et le système sanguin systémique (100). L'ensemble des données actuelles sur le système apeline/APJ indique qu'il pourrait représenter une cible thérapeutique d'intérêt pour le traitement du DT2 (101). Mayeur, *et al.* a récemment montré que l'administration intraveineuse d'apeline à des rattes gestantes augmente le passage transplacentaire du glucose et que l'injection intrapéritonéale d'apeline chez le rat nouveau-né âgé de 1 jour diminue sa glycémie systémique en augmentant la captation du glucose par les muscles squelettiques et les poumons (102). Ces données suggèrent que l'apeline exerce des fonctions physiologiques importantes durant la période périnatale. Chez la souris obèse et insulino-résistante, un traitement par l'apeline (injection pendant 14 jours à 0,1 mol/kg d'apeline 13) entraîne une diminution du poids corporel et de l'insulinémie mais aussi des triglycérides et d'acides gras libres (103) (Figure 9). Cette hormone serait donc bénéfique pour l'organisme.

Figure 9 : Effets métaboliques de l'apport aigu ou chronique exogène d'apeline au niveau périphérique (TG : triglycérides, FFA : acides gras) (41)



c. Rôle dans le tissu adipeux

L'apeline est exprimée dans le tissu adipeux blanc et dans le tissu adipeux brun bien que la plupart des adipokines ne soient exprimées que par l'un ou l'autre de ces tissus (76). Elle est également sécrétée par celui-ci, faisant d'elle une adipokine. Dans l'adipocyte, l'apeline est régulée positivement par l'obésité et l'hyperinsulinémie chez les souris et chez l'Homme (48,56).

Le système apelinergique inhibe l'adipogénèse dans le TA (103–105), diminue le relargage d'acides gras libres et inhibe la lipolyse via l'AMPK (106) dans les adipocytes matures. Ainsi, des souris déficientes en apeline voient leur obésité abdominale augmenter, de même que leurs taux d'acides gras libres (107). *In vivo* et *in vitro*, l'apeline promeut la différenciation des adipocytes dans le TA brun en augmentant la synthèse de facteurs de transcription via PI3K/Akt et l'AMPK, et serait responsable de la diminution de la masse du TA blanc, de la diminution des triglycérides dans le plasma et de la différenciation du TA blanc en TA brun chez les souris obèses (106,107).

En cas d'obésité, il y aurait une augmentation des acides gras libres relargués par les adipocytes, ce qui serait un facteur contributif au développement d'une insulino-résistance (108) et à une augmentation des taux d'apeline (expression dans les adipocytes et de l'apeline plasmatique). Ainsi, c'est l'hyperinsulinisme qui semble être indispensable à l'apparition d'une hyperapelinémie (48).

L'obésité est aussi associée à une augmentation de l'expression génique du TNF α dans le TA blanc. En culture, une augmentation endogène de TNF α est suivie 6 à 9 h plus tard par une augmentation de la concentration d'apeline dans des adipocytes (109). Cette activation de l'expression d'apeline est également retrouvée après une injection intra-péritonéale de TNF α chez des souris C57Bl/6J (109). Le TNF- α , la GH et l'insuline régulent l'expression de l'apeline dans le TA blanc (109). Dans le TA des sujets obèses, on observe une importante augmentation de la concentration en apeline, en insuline et en TNF α plasmatiques, associés à une augmentation de l'expression de l'apeline. Un régime hypocalorique pendant 12 semaines permettrait de diminuer significativement les concentrations d'apeline, d'insuline et de TNF α circulants (110).

d. Relaxation musculaire

Le taux de césariennes augmente avec l'IMC (28,111–115). L'obésité entraîne une altération de la qualité du travail : mise en route plus tardive, taux de grossesses prolongées plus élevé, travail allongé et besoins augmentés en ocytocine (116–121). Ce dysfonctionnement des contractions utérines pourrait être dues à des modifications des adipokines, secondairement à l'obésité. Certains auteurs avaient suggéré que la leptine puisse être impliquée dans ces dysfonctionnements (122–124). Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la contractilité myométriale

pourrait permettre d'améliorer la dynamique du travail des patientes obèses ou de développer de nouveaux traitements tocolytiques (122). L'apeline pourrait également être impliquée dans ces dysfonctionnements. L'équipe d'Hehir, *et al.* a mis en place un modèle *in vitro* d'étude de la contractilité du myomètre humain en présence ou non d'ocytocine. Cette étude a révélé que tout comme la leptine et la ghréline (116–121), l'apeline pourrait inhiber les contractions utérines de 38 % sans ocytocine et de 30 % avec stimulation par l'ocytocine, montrant ainsi que l'apeline pourrait également avoir un effet relaxant sur les muscles lisses non vasculaires (125,126). On peut aussi émettre l'hypothèse que chez la femme obèse, une surproduction de l'apeline pourrait maintenir plus longtemps le muscle utérin à un état quiescent et ainsi prolonger la durée de la grossesse et/ou du travail.

e. Augmentation de l'utilisation du glucose par le muscle

L'apeline stimule la phosphorylation de l'AMPK et de l'acétyl co-A carboxylase dans le muscle soléaire de manière dose-dépendante, ce qui aboutit à une augmentation du transport du glucose et une utilisation du glucose par le muscle soléaire (51) (Figure 10).

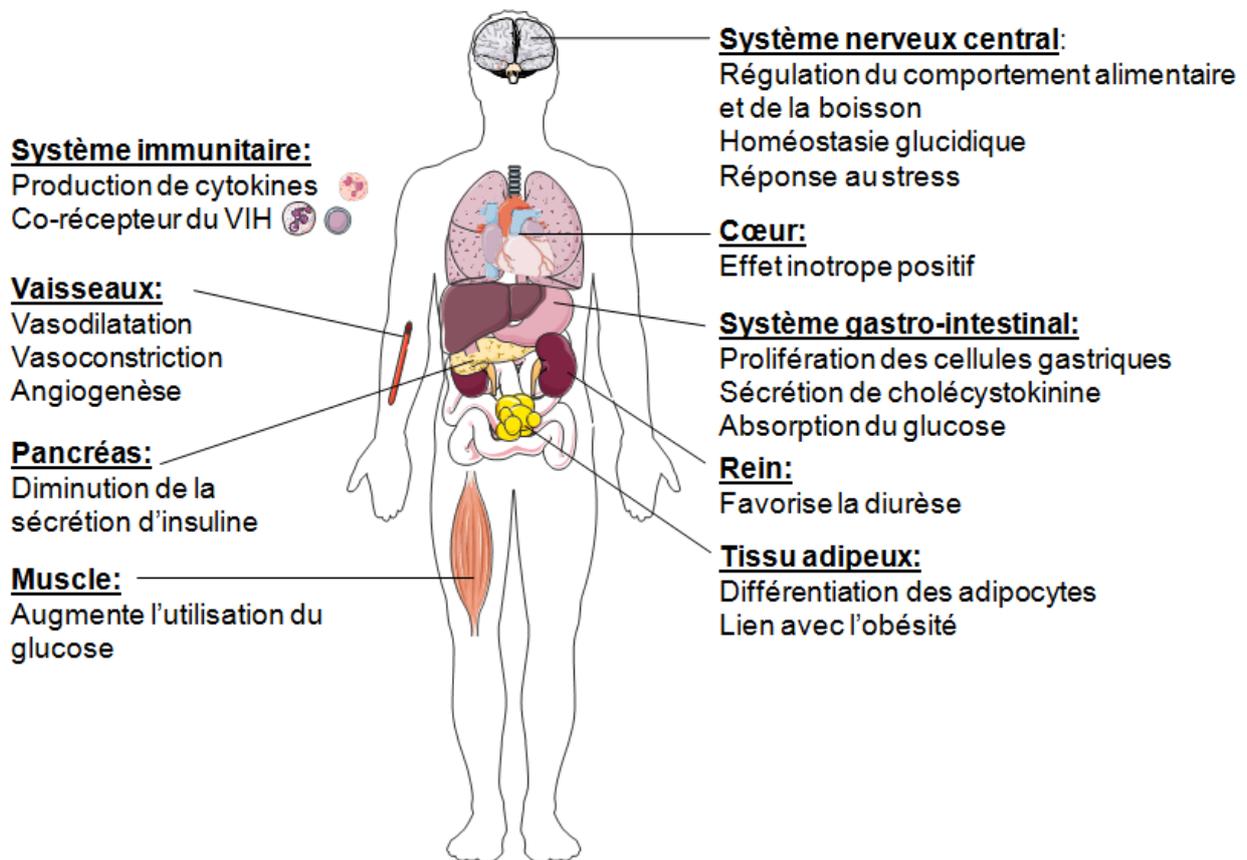
f. Absorption du glucose intestinal

Le récepteur APJ est exprimé par les entérocytes. Il a été récemment montré qu'en réponse à une charge orale de glucose chez la souris, la sécrétion d'apeline par les cellules de l'épithélium intestinal était accrue. Dans la lumière de l'intestin, l'apeline permet un transport du glucose à travers la barrière intestinale notamment en augmentant le rapport GLUT 2/SGLT-1 sur cette membrane via la phosphorylation de l'AMPK (100). Cette action sur le métabolisme glucidique s'ajoute à la stimulation de la captation du glucose dans les muscles squelettiques (Figure 10).

En conclusion, l'expression ubiquitaire et les actions variées de l'apeline dans l'organisme démontrent la complexité du système apelinergique. Son expression dès la vie fœtale indique que l'apeline pourrait exercer un rôle dans la programmation de pathologies métaboliques de l'adulte (127). Sa présence au niveau placentaire et son expression dès la vie fœtale suggèrent que l'apeline puisse avoir un rôle dans le développement fœto-placentaire.

Figure 10 : Principales actions de l'apeline d'après Falcao-Pirés 2010 et Castan-Laurell 2011 (41,85).

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Médical Art (128).



II.2.4. Origine de l'apeline plasmatique et ses modulations

L'apeline est abondamment présente dans le plasma. Les isoformes les plus présentes dans le plasma humain sont l'apeline-13, la (Pyr¹)apeline-13 et l'apeline-17. Nous ne savons pas à l'heure actuelle quels tissus contribuent le plus aux taux d'apeline circulante. Il est probable que l'ensemble des organes sécrètent de l'apeline dans la circulation sanguine, et que l'apelinémie dépendent donc de la synthèse de l'ensemble de ces productions. Il est donc indispensable de s'intéresser à l'ensemble des organes sécrétant de l'apeline pour comprendre ses variations plasmatiques.

Toutefois, chez l'humain, l'étude complète des sécrétions de l'apeline est difficile à concevoir. Les études présentes dans la littérature sont donc surtout descriptives, ou bien concernent l'animal.

II.2.5. Apeline chez l'individu obèse

Dès les années 2000, l'apeline a été détectée dans le tissu adipeux (67) et il a été montré que non seulement elle était produite par les adipocytes humains et murins, mais en plus qu'elle était sécrétée par ceux-ci et donc pouvait être considérée comme une adipokine (48). Ceci a donc ouvert une nouvelle voie d'investigation pour établir un lien entre apeline et désordres métaboliques (obésité, DT2...).

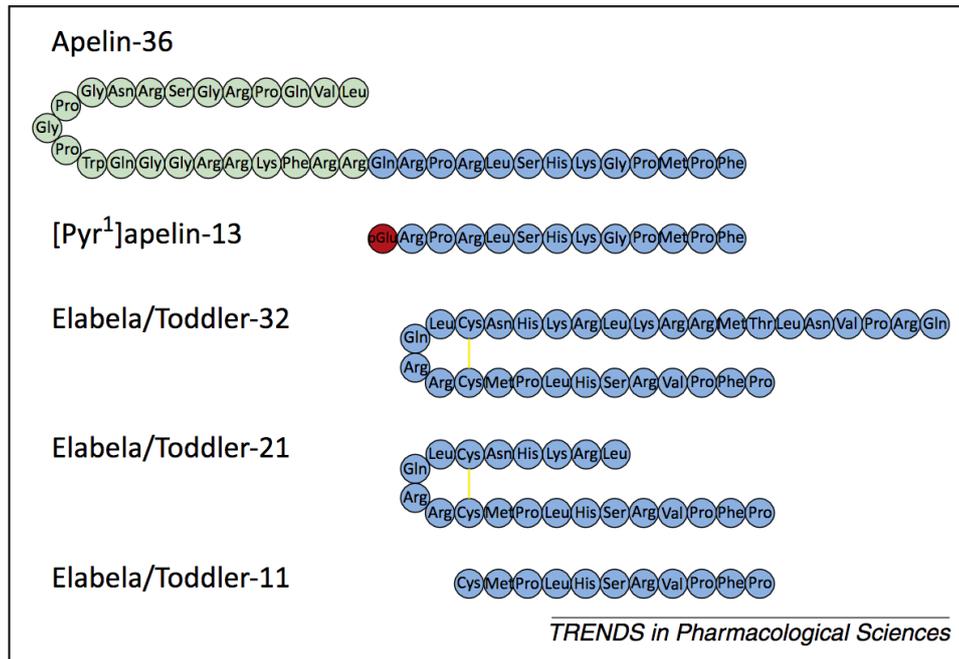
Par ailleurs, une corrélation positive a été retrouvée par certains auteurs entre l'apelinémie et l'IMC (129,130), ce qui suggère un lien entre apeline et obésité. Il semblerait que l'apelinémie soit plus souvent augmentée en cas d'obésité morbide (129,131) ou d'hyperinsulinisme (48,109,110,130,132). Cependant, les résultats concernant apeline et obésité sont controversés, notamment chez les patients ayant une altération du métabolisme glucidique. Ainsi, Reineher, *et al.* n'a pas mis en évidence de différence entre l'apelinémie d'enfants de poids normal et d'enfants obèses (133). D'autres auteurs ont même montré des résultats inverses, à savoir une diminution de l'apelinémie dans le cadre du diabète de type 2 (134,135).

L'apeline aurait donc un effet métabolique bénéfique chez les sujets obèses, et pourrait donc, à terme, être une piste intéressante pour le traitement de l'obésité et du diabète.

II.3. ELABELA / Toddler

ELABELA / Toddler (ELA) est un peptide identifié plus récemment, caractérisé en 2013 par l'équipe de Reversade B, *et al.* à l'Institut de Biologie Médicale de Singapour. Son nom vient de Epiboly LAte Because of Endoderm LAte (ou vice versa) qui est le premier phénotype observable chez le zébrafish KO. Le gène humain ELABELA code pour une protéine de 54 acides-aminés ayant un peptide signal dans sa partie N-terminale. Ce gène a été identifié dans une région non codante du génome (64). Après clivage de ce peptide signal, l'hormone mature ELA est constituée de 32 acides-aminés et doit être sécrétée pour devenir active. ELA présente 3 isoformes de 32, 21 et 11 acides aminés, basées sur le clivage par une peptidase (136,137) (Figure 11). Sa demi-vie est de quelques minutes. Elle est, comme l'apeline, ligand du récepteur membranaire APJ. Ces 2 ligands ont une zone de liaison commune et peuvent donc entrer en compétition au niveau d'APJ. ELA a un second récepteur membranaire dont la voie de signalisation est PI3K/AKT mais dont le récepteur n'est pas encore identifié.

Figure 11 : Séquences des peptides apeline et ELABELA/Toddler, apeline-36, [Pyr¹]apelin-13, Elabela-32; Elabela-21, Elabela-11. Les lignes jaunes correspondent aux ponts disulfure (64)



Via sa liaison à APJ, ELA a un rôle sur l'angiogénèse et sur la vasodilatation (138). Par ailleurs, elle diminue l'effet de l'AT2 chez la souris (64). Chez l'adulte, l'injection intra-vasculaire d'ELA synthétique chez le rat entraîne une diminution de la pression artérielle et augmente la contractilité cardiaque. L'axe APJ-ELA protégerait de l'insuffisance cardiaque induite par l'hypertension artérielle (HTA), possiblement par suppression de l'expression d'ACE et de la voie pathogène de l'AT2. Les effets d'ELA et de l'apeline sur l'expression d'ACE et ACE2 impliquent des mécanismes précis pour l'activation d'APJ induite par un ligand et une signalisation en aval (139). ELA pourrait avoir une action directe sur le rein, car elle est exprimée dans les reins de souris, de rat et humains.

ELA est également abondamment sécrétée par les cellules souches embryonnaires humaines n'exprimant pas APJ et elle est nécessaire à la survie et au renouvellement de ces cellules. Elle est exprimée dans les cellules natives de l'ectoderme et entraîne un signal dans les futures cellules de l'endoderme exprimant APJ. Dans les embryons de zébrafish, elle intervient au moment de la gastrulation en permettant l'expression de gata5 et de sox17. Elle régule la migration des progéniteurs voués à se différencier en cellules cardiaques. Elle agirait par chimérisme entraînant la migration des angioblastes.

Ainsi, les zébrafish KO pour ELABELA ont des malformations sévères, incluant souvent un cœur rudimentaire ou absent. Les zébrafish ayant un double KO pour ELABELA et pour apeline ont une

absence de migration des angioblastes pour former les vaisseaux primaires, à savoir l'aorte et la veine cardinale (Tableau 1) (64). Chez la souris, il a été montré que ELABELA est nécessaire à la vascularisation du sac vitellin et à la genèse cardiaque. En comparaison, les souris KO pour apeline, la morphologie cardiaque de leurs fœtus est normale, la TA est normale. On observe une légère diminution de la contractilité cardiaque (140). Les animaux développent une insuffisance cardiaque en vieillissant et ont une moindre capacité physique (140,141). Les souris KO pour APJ, les fœtus ont plus souvent des malformations cardiaques et vasculaires (Tableau 1) (54,142,143).

Tableau 1 : Comparaison des phénotypes associés au récepteur de l'apeline. D'après Yang 2015 (64)

Souris KO Apeline	Souris KO APJ	Zébrafish mutant ELABELA
Ratio de naissance mendélien	Souriceaux homozygotes non viables	Mutants non viables
Morphologie cardiaque normale	Malformations cardiaques sévères	Cœur rudimentaire ou absent
Pression artérielle normale	Pression artérielle normale	
Diminution modérée de la contractilité cardiaque	Diminution modérée de la contractilité cardiaque	
Diminution significative capacité physique	Diminution significative capacité physique	
Défaillance cardiaque sévère si HTA	Défaillance cardiaque marquée si HTA	

III. LE SYSTEME APELINERGIQUE AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE

III.1. Grossesse normale

Lors de la grossesse, il existe une augmentation physiologique du poids corporel et une augmentation du tissu adipeux. Ceci aboutit à une modification du métabolisme maternel et des cytokines sécrétées par le tissu adipeux (144). La grossesse entraîne de nombreuses modifications métaboliques : une diminution de la sensibilité à l'insuline, une hyperlipidémie transitoire et une augmentation du stress oxydatif (145). Par ailleurs, elle est marquée par la modification du fonctionnement de nombreux organes, notamment de l'utérus et de la glande mammaire, ainsi que par le développement d'un nouvel organe, temporaire, le placenta. Le placenta sécrète de nombreuses hormones, dont l'apeline (146).

Il existe à ce jour peu d'études dans la littérature évaluant l'activité et la fonction du système apelinergique au cours de la grossesse. Il est supposé que l'apeline pourrait être impliquée dans des adaptations physiologiques maternelles telles que les changements cardiovasculaires, l'homéostasie des liquides et les changements métaboliques qui ont lieu pendant la grossesse.

III.1.2. Taux d'apeline plasmatique d'apeline chez la mère au cours de la grossesse

Le système apelinergique semble être crucial pour le développement du fœtus, car chez la souris déficiente en APJ, on observe des malformations embryonnaires précoces et une létalité embryonnaire élevée (140). Ce système semble donc être critique pour le développement de l'unité fœto-placentaire et le contrôle de l'activité placentaire chez les rongeurs et chez l'Homme.

Les concentrations plasmatiques d'apeline diffèrent selon que la femme soit enceinte ou non. En effet, plusieurs organes la synthétisant voient leurs fonctions se modifier au cours de la grossesse (glande mammaire, tissu adipeux...), et d'autres organes apparaissent (placenta, membranes amniotiques) (147–149). Ces nouveaux organes sécrètent également de l'apeline.

Ainsi, Van Mieghem, *et al.* a montré que chez le rat, les taux plasmatiques maternels d'apeline aux 7^{ème} (E7) et 14^{ème} jours (E14) de la gestation étaient comparables aux taux plasmatiques de rates

femelles non gestantes (150). Cependant, il y avait une diminution de 50% de l'apeline maternelle circulante à E22, associée à une augmentation de l'expression placentaire et de l'activité de ACE2, qui catabolise l'apeline (151). Par ailleurs, une fœtectomy partielle (réduction du nombre d'unités fœto-placentaires) réalisée à E16 augmentait de 23% l'apelinémie maternelle à E22 (152). Ces résultats suggèrent que, en fin de grossesse, l'ACE2 placentaire pourrait accélérer le métabolisme de l'apeline et sa clairance chez la mère. La diminution de l'apelinémie maternelle à terme a également été rapportée par Mayeur, *et al.* entre E17 et E21 chez les rats Wistar. Dans cette étude, les taux d'apeline plasmatiques maternels étaient diminués au cours de la 1^{ère} semaine de gestation, augmentaient progressivement entre E7 et E17, puis étaient réduits à terme (102). De même, chez la souris, l'apelinémie maternelle était comparable à E6.5 et E12.5, mais elle était réduite à proximité du terme, à E18.5 (153).

Chez l'Homme, peu d'études longitudinales sont disponibles sur l'évolution des taux d'apeline plasmatique maternelle au cours de la gestation. Kourtis, *et al.* a montré, dans une grande cohorte de femmes enceintes (n=106), que l'apelinémie était diminuée de 10% à 24-28 semaines d'aménorrhée (SA) par rapport aux mères témoins non enceintes (4.45 ng/ml (8-70) vs 5.00 ng/ml (9-30), $p < 0.05$) (76). Cette diminution des taux sériques d'apeline au milieu de la grossesse serait suivie par une réaugmentation au 3^{ème} trimestre (1.7 vs 1.4 ng/ml) (152).

Chez la femme, l'apelinémie serait donc diminuée lors de la 2^{ème} moitié de la grossesse (76,150), notamment en cas d'hypertension associée (154). Ces modifications se retrouveraient aussi dans le placenta. L'apeline ayant un rôle pro-angiogénique et hypotenseur, ces résultats sont en accord avec les symptômes observés au cours de la pré-éclampsie. Ces résultats sont toutefois controversés. Cobellis, *et al.* a observé une augmentation de l'apeline placentaire et de son récepteur en cas de prééclampsie, leur hypothèse étant que cette surexpression pourrait s'opérer pour compenser les perturbations vasculaires liées au syndrome prééclamptique (155). Ces variations restent donc encore mal comprises et le rôle du système apelinergique dans le placenta et chez le fœtus reste peu étudié.

III.2. Le placenta

III.2.1. Rôles du placenta

Le placenta est un organe transitoire, situé à l'interface entre la mère et le fœtus, servant de zone d'échanges. Il apporte des nutriments et de l'oxygène dans le sang fœtal et élimine les déchets circulants fœtaux, et protège le fœtus contre les agents infectieux. Il s'agit également d'un organe endocrinien produisant des œstrogènes, de la progestérone et de nombreuses autres hormones telles que la leptine ou encore l'apeline (156).

III.2.2. Le système apelinergique dans le placenta

L'apeline est exprimée dans le placenta (83), mais en cas d'HTA ou de prééclampsie pendant la grossesse, l'expression placentaire d'apeline est considérablement diminuée (environ 60 %) (157) et les concentrations d'apeline circulante dans le sang maternel sont diminuées (154). L'expression de l'apeline et d'APJ ont été décrites dans les placentas des rongeurs et humains du milieu à la fin de la gestation (47,102,152,153). Aux premiers stades embryonnaires, l'activation de l'APJ a été impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires dans le blastocyste humain (158) et dans le développement de l'endoderme chez le zébrafish (136,137) suggérant que le système apelinergique est exprimé dès le début de la gestation et qu'il pourrait être impliqué dans le développement placentaire. Le zébrafish est certes un modèle assez éloigné des espèces humaines et murines, mais permet d'étudier les premiers stades de développement. Etant donné qu'un défaut d'activation de l'APJ dans les embryons de zébrafish entraîne une altération de la migration des angioblastes et des progéniteurs cardiaques (159), il est très probable que le système apelinergique puisse contrôler l'angiogenèse placentaire au début de la gestation.

Chez le rat, les taux placentaires de l'ARNm de l'apeline sont élevés et stables entre E13 et E17 et ensuite réduits jusqu'à terme (102). L'expression placentaire d'APJ a été fortement modulée pendant cette période, avec une augmentation de E13 à E17 puis une diminution jusqu'à E21 (102). À terme, l'apeline a été localisée dans des cellules musculaires lisses des artérioles fœtales dans le labyrinthe de rat qui régule principalement les échanges maternels-fœtaux d'oxygène et de nutriments, suggérant que l'apeline pourrait, à ce niveau, affecter le tonus vasculaire loco-régional et donc le transport transplacentaire. Dans cette continuité, nous avons récemment démontré, chez le rat, qu'une administration maternelle d'apeline augmentait le transport transplacentaire du glucose vers le fœtus, ce qui suggère que cette hormone contrôle l'homéostasie fœtale du glucose (102).

Chez l'Homme, l'apeline et APJ sont présents dans tous les compartiments placentaires, cytotrophoblaste, syncytiotrophoblaste, cellules endothéliales et dans le stroma des villosités placentaires (155). En outre, le modèle d'expression du système Apeline / APJ est modulé tout au long de la grossesse, avec une légère diminution de l'expression de l'apeline entre le premier et le troisième trimestre de gestation tandis que l'APJ augmente au troisième trimestre (155). La localisation placentaire de l'apeline et d'APJ est également légèrement modulée entre ces périodes. Au 1^{er} trimestre de gestation, l'apeline et APJ ont été localisés à des niveaux d'expression modérés / intenses dans des cellules cytotrophoblastiques formant la couche proliférative interne des villosités placentaires. Une immunoréactivité modérée a également été observée dans le stroma des villosités placentaires et à un niveau plus faible dans les cellules syncytiotrophoblastiques. Au cours du 3^{ème} trimestre de gestation, les niveaux d'expression d'apeline étaient diminués dans les cellules cytotrophoblastiques et dans le stroma des villosités placentaires, alors que l'expression de l'APJ était fortement augmentée, principalement dans les cellules cytotrophoblastiques et dans les cellules endothéliales à l'intérieur du stroma placentaire (155). Dans l'ensemble, ces données ont démontré que le système apelinergique était principalement localisé dans les cellules cytotrophoblastiques qui représentent la population proliférative à l'intérieur des villosités placentaires. Cette localisation particulière pourrait suggérer un rôle possible de ce système dans le contrôle de la prolifération cellulaire comme cela a été démontré dans les cellules épithéliales gastriques (75) et dans les cellules endothéliales ombilicales (44).

Récemment, Yamaleyeva, *et al.* a montré que la (Pyr¹)apeline-13 était la forme moléculaire prédominante de l'apeline dans les villosités choriales humaines et que, *ex vivo*, l'apeline était sécrétée par celles-ci (146). Une telle sécrétion placentaire d'apeline *ex-vivo* a également été rapportée chez le rat (102). Ainsi, ces données suggèrent que, en plus des actions paracrines de l'apeline, le placenta pourrait également être une source d'apeline circulante pour la mère et/ou le fœtus. En conséquence, chez les nouveau-nés, une diminution des taux plasmatiques d'apeline a été retrouvée au 1^{er} jour de vie en comparaison avec les taux d'apeline mesurés au cordon. Chez le rat, les placentas sont capables de sécréter *ex-vivo* une quantité élevée d'apeline à l'E17 et cette sécrétion coïncide avec le taux d'apeline maximal dans les plasmas maternels et fœtaux (102). Inversement, Van Mieghem, *et al.* a constaté qu'une réduction fœto-placentaire augmentait considérablement les taux d'apeline plasmatique maternelle chez les rates (150). En conclusion, la sécrétion placentaire d'apeline ne semble pas être impliquée de manière importante dans le pool d'apeline circulant maternel et sa contribution dans les taux fœtaux en circulation reste à démontrer.

Les voies de dégradation placentaires de l'apeline ne sont pas complètement caractérisées. Chez le rat, l'ACE2 des artérioles fœtales localisées dans le labyrinthe pourrait être impliquée (150). Chez l'Humain, une autre enzyme nommée proxylcarboxypeptidase (PRCP) a récemment été caractérisée comme inactivant la (Pyr¹)apeline-13 (160). ACE2 appartient au système rénine-angiotensine (SRA) et, en plus d'inactiver l'apeline, l'ACE2 hydrolyse également le peptide vasoconstricteur de l'AT2 (151). Une caractéristique essentielle émergente du système apelinergique dans le placenta est son interaction avec le SRA. Chez l'adulte, l'apeline exerce un effet inotrope positif sur le cœur et provoque simultanément une vasodilatation dans la circulation périphérique due à la libération de NO (oxyde nitrique) (47). Au-delà des mécanismes liés au NO, l'APJ est également un régulateur négatif de l'action d'AT2, car ce récepteur peut former des hétérodimères avec AT1 et antagonise les effets AT2 grâce à des modifications de la signalisation descendante (161). Étant donné que l'ACE2 est principalement localisé dans la couche musculaire lisse des artérioles fœtales dans le labyrinthe des rats et dans les villosités chorales humaines (150) proche des composants du système apelinergique et du SRA placentaire, nous pouvons postuler que ces deux systèmes peuvent exercer localement des actions opposées sur la tension artérielle et le tonus vasculaire dans le placenta. Cette hypothèse est renforcée par des résultats récents utilisant des villosités chorales qui ont démontré que l'AT2 diminuait la sécrétion d'apeline tandis que le blocage AT1 augmente cette sécrétion (146). Enfin, comme chez l'adulte, la plupart des études sur le système apelinergique rapportent des actions cardiovasculaires et métaboliques. Au cours de la grossesse, ce système a principalement été étudié dans les grossesses compliquées de pré-éclampsie et de diabète dans les modèles animaux et humains.

III.3. Le fœtus

III.3.1. Le taux d'apeline plasmatique chez le fœtus

Seules deux études chez les rongeurs ont étudié l'apelinémie fœtale. Chez la souris, l'apelinémie fœtale était six fois plus élevée que le taux maternel à E18.5 (153). Chez le rat, les taux d'apeline plasmatique fœtale étaient deux fois plus élevés que les taux maternelles à E17, puis diminuaient et étaient similaires au taux maternel à E21 (162). Le fœtus aurait donc des taux plasmatique d'apeline supérieurs à ceux de sa mère, possiblement du fait de la sécrétion placentaire d'apeline.

Malamitsi-Puchner, *et al.* a étudié les taux plasmatiques d'apeline chez 40 femmes et leurs nouveau-nés à la naissance (97). Ils ont montré que l'apelinémie était 2 fois plus importante chez le fœtus que

chez les mères (4 ng/ml vs 1.9 ng/ml, $p < 0.001$), suggérant que l'apeline était présente à un taux élevé chez le fœtus en développement.

III.3.2. Le système apelinergique chez le fœtus

La présence de taux plasmatiques élevés d'apeline chez les fœtus humains et chez les rongeurs suggère un rôle du système apelinergique dans le développement du fœtus. Le déficit en apeline retarde le développement vasculaire aux niveaux oculaire et cardiaque (95,163) alors que la perte d'APJ provoque des malformations embryonnaires précoces et conduit à une augmentation de la létalité embryonnaire variable due à un retard de croissance important et à des malformations cardiaques (140). Les différences de phénotypes fœtaux entre les animaux génétiquement déficients en apeline et en APJ peuvent impliquer un nouveau ligand récemment identifié pour APJ connu sous le nom de ELABELA / Toddler (136,137), caractérisé chez le zébrafish, qui agit principalement lors du développement embryonnaire. Jusqu'à présent, le thème primordial du système apelinergique pendant la vie fœtale est son implication vitale dans le développement du cœur, dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales. En lien avec ces données, l'apeline est abondamment exprimée dans le cœur fœtal et dans l'endothélium des vaisseaux embryonnaires (164) et, l'expression d'APJ, est régulée positivement lors de la formation de nouveaux vaisseaux puis négativement une fois leur formation achevée (95). Le couple apeline / APJ est également constitutivement fortement exprimé (par rapport aux tissus adultes) dans les poumons et le tractus gastro-intestinal en développement où ce système contrôle la prolifération cellulaire et peut être impliqué dans la morphogenèse prénatale de ces organes (75,165). Enfin, considérant que l'apeline est impliquée dans le métabolisme énergétique chez les adultes, on peut spéculer que l'apeline pourrait avoir un rôle similaire dans l'utérus. En effet, chez les fœtus de rate à E21, nous avons démontré que l'administration d'apeline augmentait l'absorption du glucose dans le poumon et le muscle fœtal de manière indépendante de l'insuline alors que, à des concentrations plus élevées, cette administration exogène d'apeline était capable de réduire l'insulinémie fœtale et donc d'augmenter la glycémie fœtale (102). Ces observations suggèrent que l'apeline pourrait être impliquée dans le métabolisme énergétique fœtal et la régulation de la croissance fœtale. Cette hypothèse a également été posée dans plusieurs autres études récentes (102,152,153,166).

III.3.3. Croissance fœtale

La croissance fœtale dépend de nombreux facteurs, dont l'environnement utérin maternel, le fonctionnement du placenta et le transfert des nutriments de la mère vers le fœtus.

Sur le plan hormonal, la croissance fœtale est régulée en grande partie par l'insuline. L'insuline ne traverse pas la barrière hémato-placentaire. Elle est produite par le pancréas du fœtus dès la 8^{ème} semaine de grossesse (167). Les récepteurs hépatiques à l'insuline apparaissent entre 19 et 25 semaines d'aménorrhée (SA). Les IGF-1 et IGF-2 sont exprimés dans l'ensemble des tissus fœtaux, l'IGF-2 étant le principal facteur de croissance *in utero*. Il permet la croissance fœtale, la croissance placentaire, et agit sur le transfert des nutriments. Une étude chez des souris génétiquement déficientes (KO, knocked-out) a montré qu'une altération de l'IGF-1, de l'IGF-2 ou du récepteur de l'IGF-1 réduisait considérablement la croissance des souriceaux, alors que la surexpression de l'IGF-2 est plutôt corrélée à une accélération de la croissance fœtale (168,169). L'hyperinsulinisme, les excès de nutriments (acides gras libres, triglycérides, ou glucose) et les altérations de la fonction placentaire (débit sanguin utéro-placentaire ou transport de nutriments) peuvent aussi altérer la croissance de la descendance (170).

La croissance fœtale est influencée par le patrimoine génétique des parents et par les origines ethniques. Chez l'Homme, il existe des courbes de croissance standardisées, permettant de déterminer si la croissance fœtale est considérée comme normale, insuffisante (Petit pour l'Âge Gestationnel, PAG, < 10^{ème} percentile : RCIU < 3^{ème} percentile), ou excessive (macrosomie, > 90^{ème} percentile) (171). Les femmes présentant un IMC pré-conceptionnel bas seraient plus susceptibles de donner naissance à des enfants avec un faible poids de naissance, et à l'inverse, les femmes avec un IMC pré-conceptionnel élevé donneraient plus souvent naissance à des enfants ayant un poids de naissance élevé (172). Il a ainsi été développé des courbes de croissance spécifiques tenant compte de ces paramètres, ainsi que de la taille de la mère, de sa parité et du sexe du fœtus (173,174). En 2009, une étude menée par Siega-Riz, *et al.* a montré une association entre un gain de poids inférieur aux recommandations et la naissance de bébés avec un faible poids de naissance. Par opposition, avec un gain de poids supérieur aux recommandations, les mères donnaient naissance plus souvent à des enfants macrosomes (173,174). Ces données peuvent être mises en relation avec le transport placentaire des nutriments au fœtus. Des « signaux » de faible disponibilité de nutriments comme des concentrations basses d'insuline et de leptine et une concentration élevée d'adiponectine seraient associées à une diminution du transport des nutriments et en conséquence une diminution de la croissance fœtale. A l'inverse, une insulinémie et une leptinémie élevée avec une concentration

plasmatique en adiponectine basse refléteraient une abondance de nutriments et augmenterait le transport des nutriments au niveau placentaire, ayant comme conséquence une accélération de la croissance fœtale. L'apeline pourrait également être l'un de ces marqueurs de la croissance fœtale (175).

III.3.4. Troubles de la croissance fœtale

Une caractéristique fréquente de la PE maternelle, du DG et de l'obésité est une modification de la croissance fœtale. Plusieurs auteurs ont suggéré que l'apelinémie puisse être un marqueur prédictif potentiel des altérations de la croissance fœtale (97,152,176–179). De plus, le transfert transplacentaire d'apeline pourrait avoir un impact sur la croissance du fœtus (97). Cependant, encore une fois, les études cliniques montrent des résultats très contradictoires. Dans les grossesses normales, il n'a pas été retrouvé de corrélation entre les taux d'apeline dans le sang maternel et du cordon avec le poids du nouveau-né à la naissance. Dans des cohortes de femmes avec un DG, Aslan, *et al.* a rapporté un taux d'apeline plasmatique maternel plus élevé chez les patientes avec DG et une corrélation négative avec le poids de naissance (177) alors que, dans une autre cohorte de DG, Oncul, *et al.* n'a trouvé aucune association entre l'apelinémie, maternelle ou au cordon, et le poids de naissance (179). Dans les grossesses compliquées de retard de croissance intra-utérin (RCIU), Inuzuka, *et al.* a trouvé une corrélation positive entre l'apelinémie maternelle et le poids de naissance des nouveau-nés (RCIU et PE) (178) et, Van Mieghem, *et al.*, a rapporté que les taux d'apeline plasmatiques maternels sont environ 30% plus faibles en cas de grossesse compliquée d'un RCIU et ce dès les stades précoces de la grossesse (entre 15 et 35 semaines de gestation) (152). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'apelinémie n'est pas un marqueur fiable de la croissance fœtale dans des grossesses normales et compliquées de DG, mais qu'il pourrait s'agir d'un indice de RCIU. En accord avec ces conclusions, nous avons constaté que chez le rat, une restriction alimentaire maternelle sévère réduisait considérablement l'apelinémie maternelle et fœtale ainsi que la vitesse de croissance du fœtus (102). Enfin, il a été montré récemment que le taux d'apeline plasmatique dans le cordon ombilical était corrélé positivement aux biomarqueurs osseux circulants chez les nouveau-nés ayant un RCIU (180). En cas de prématurité, une réduction *in utero* de l'activité du système apeline / APJ a également été démontrée dans deux études (181,182).

III.4. Accouchement : Rôle de l'apeline dans la contractilité myométriale (28,183)

Les mécanismes et signaux qui synchronisent et déterminent le début du travail sont encore mal connus, car les études chez la femme enceinte sont limitées et les modèles animaux sont souvent assez éloignés du modèle humain. Une meilleure compréhension de ces processus pourrait pourtant permettre de prévenir le travail prématuré (122). Comme d'autres adipokines, en particulier la leptine influence négativement le déclenchement du travail (122–124), l'apeline pourrait moduler la contraction utérine.

L'apeline et son récepteur APJ sont exprimés dans l'utérus de rongeurs mais aussi dans l'endomètre humain (126). Les études de biopsies de myomètres humains *in vitro* ont révélé que l'apeline inhibait les contractions utérines de l'ordre de 37% (28,183).

Dans une étude de contractilité réalisée *in vitro*, Hehir, *et al.* ont montré qu'une élévation de la concentration en apeline dans le milieu d'étude était associée à une diminution de la contractilité spontanée des fibres myométriales (inhibition de 36.8% +/- 6.4%) et de la contractilité induite par l'ocytocine (inhibition de 30.4% +/- 4.6%), ce qui suggère un rôle inhibiteur qui pourrait avoir un impact sur le déroulement du travail des femmes obèses (184). Toutefois, ces résultats sont à nuancer puisque cette étude a été réalisée sur des prélèvements de myomètre obtenus chez des femmes lors de césariennes programmées, en dehors du travail.

L'expression d'APJ et l'influence de l'apeline sur la contractilité myométriale pourraient varier au cours du travail (184). Ainsi, l'apeline pourrait jouer un rôle sur la contractilité des cellules musculaires lisses. Il a été montré un effet inotrope positif et vasodilatateur sur la circulation périphérique. Le muscle lisse utérin pourrait ainsi se relâcher sous influence de l'apeline au même titre que les cellules musculaires lisses vasculaires (185). L'apeline et son récepteur APJ, sont retrouvés au niveau du placenta et des membranes fœtales. Lim, *et al.* retrouve une diminution du taux d'apeline dans les membranes après travail spontané par rapport aux femmes n'ayant pas eu de travail mais une césarienne. Ils supposent dans leur étude le rôle anti-inflammatoire de l'apeline dans la régulation des médiateurs du travail. L'inhibition de l'apeline permettrait la libération des cytokines pro-inflammatoire nécessaire pour l'induction du travail et donc des contractions (186).

III.5. Nouveau-né

III.5.1. Apelinémie chez le nouveau-né

Malamitsi-Puchner, *et al.* a étudié les taux plasmatiques d'apeline chez 40 mères et leurs nouveau-nés à la naissance, au 1^{er} et au 4^{ème} jours de vie (97). Ils ont montré que l'apelinémie était 2 fois plus importante chez le fœtus que chez les mères, suggérant que l'apeline est présente à un taux élevé chez le fœtus en développement. De plus, chez les nouveau-nés, une baisse de l'apelinémie a été observée au 1^{er} et au 4^{ème} jours néonatal, ce qui suggère que le placenta pourrait être une source d'apeline plus importante que le tissu adipeux foetal ou que l'apeline provient aussi en partie du plasma maternel (97). En effet, l'apeline est 10 fois plus exprimée dans le placenta que dans le tissu adipeux chez le nouveau-né (187). Cependant, jusqu'à maintenant, l'existence d'un transport trans-placentaire d'apeline entre compartiments maternels et fœtaux demeure inconnue.

III.5.2. Système apelinergique chez le nouveau-né

Le couple apeline / APJ est fortement exprimé dans les poumons et le tractus gastro-intestinal en développement (75,165), plus fortement que chez l'adulte. Elle pourrait être utile dans la morphogénèse, puis dans la croissance de ces organes.

Chez l'adulte, l'apeline est impliquée dans le métabolisme énergétique. Elle pourrait avoir un rôle similaire chez le nouveau-né (102,152,153,166). En effet, il a été montré que, chez les fœtus de rate à E21, l'administration d'apeline augmentait l'absorption du glucose dans le poumon et le muscle foetal de manière indépendante de l'insuline et que, à des concentrations plus élevées, l'apeline réduisait l'insulinémie foetale (102).

III.6. Allaitement

III.6.1. Allaitement maternel et diminution du risque d'obésité à l'âge adulte chez l'enfant

Les bénéfices de l'allaitement maternel sur la santé du nouveau-né à court et à long terme ne sont plus à démontrer (188). Il permet notamment de réduire le risque pour l'enfant de développer une obésité ou un diabète de type 2 à l'âge adulte (188–190). Une nutrition postnatale « adaptée » permet la croissance et le développement optimal du nourrisson, le lait maternel étant l'alimentation la plus adaptée pour l'enfant en cours de développement. Chez les mammifères, les tissus et organes

des nouveau-nés ne sont pas pleinement matures à la naissance. Par exemple, chez les rongeurs (et de façon moins importante chez l'Homme), l'ontogenèse de l'intestin se poursuit en période postnatale et est contrôlée par des facteurs génétiques (191), mais aussi environnementaux, tel que l'alimentation via le lait (55). Ainsi, la période postnatale précoce est associée à de profondes modifications structurales et fonctionnelles de l'intestin comme la fission des cryptes de la muqueuse (192) ou la mise en place du microbiote (193), des enzymes digestives entérocytaires ou encore des transporteurs de nutriments de la bordure en brosse (55,191).

III.6.2. Apeline et lactation

A ce jour, plus d'une vingtaine d'hormones peptidiques ont été répertoriées dans le lait humain : leptine, ghréline, adiponectine, insuline, apeline... La présence de la leptine dans le lait a été mise en évidence en 1997 chez l'Homme (194). Chez l'animal, il a été montré que cette hormone était capable de passer de la circulation maternelle vers la circulation du nouveau-né via son transport dans le lait et son passage à travers la muqueuse intestinale postnatale caractérisée par sa grande perméabilité. De plus, l'administration orale de leptine chez le nouveau-né est capable de réguler sa prise alimentaire, suggérant un rôle important de la leptine du lait dans la régulation de l'homéostasie énergétique postnatale du petit (194,195).

Le récepteur de la leptine est présent au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle chez le rat adulte (196). Il est donc fortement probable qu'il en soit de même dans la période postnatale précoce.

L'apeline est elle aussi fortement exprimée dans la glande mammaire (150,197,198). La glande mammaire de rate contient également une forte expression de l'ARNm de la pré-pro-apeline et de la protéine (61). L'expression génique de l'apeline dans la glande mammaire augmente fortement pendant la gestation chez le rat, surtout au moment de la parturition. Les taux d'expression restent élevés au début de la lactation puis diminuent progressivement (61). De manière intéressante, cette hormone est aussi présente dans le lait maternel chez la femme, chez le bovin et chez les rongeurs (61,199,200). Il est probable que l'apeline du lait puisse exercer des fonctions biologiques chez le nouveau-né via son action sur le tube digestif en période de lactation. En effet, le récepteur APJ a été localisé dans les entérocytes de rats (100,201,202). Dans l'étude d'Aydin, et al., l'apeline-13 et l'apeline-36 ont été identifiées dans le lait humain. Les concentrations étaient diminuées dans le colostrum et dans le lait mature chez des femmes obèses avec DG en comparaison avec des femmes obèses sans DG (199). Compte tenu des actions de l'apeline sur l'angiogénèse et sur la vasodilatation et l'augmentation de l'apeline dans la glande mammaire en début de lactation, il est probable que

l'apeline soit impliquée dans le fonctionnement mammaire et la production de lait, par exemple en augmentant la vascularisation de la glande.

Chez la femme obèse, la lactation est moins performante que chez la femme de poids normal. Chez la souris obèse, la viabilité des souriceaux était diminuée (viabilité 15%), la production de lait et la mammopoïèse réduites (33% et 200% respectivement) (203). Cette diminution de la production de lait pourrait être due au développement d'une résistance à la prolactine au niveau de la glande mammaire et de l'hypothalamus chez les souris obèses, sous contrôle de la leptine (203).

Toutefois, même si l'allaitement maternel est plus difficile chez les femmes obèses, celui-ci doit être privilégié dans ce contexte car il permettrait de réduire de 13 à 22% le risque pour l'enfant de développer un surpoids ou une obésité (204–206).

IV. LE SYSTEME APELINERGIQUE AU COURS DE LA GROSSESSE PATHOLOGIQUE

IV.1. La pré-éclampsie

La prééclampsie (PE) est une complication fréquente de la grossesse qui affecte environ 5 à 7 % des grossesses en France (soit 40 000 cas/an) et dans le monde (207). La PE est associée à une morbidité et une mortalité maternelles périnatales, représentant près de 15 à 20% de la mortalité liée à la grossesse et un risque de naissance prématurée et de RCIU (207).

Il s'agit d'une maladie multifactorielle complexe impliquant des facteurs génétiques maternels et fœtaux et des facteurs environnementaux, dont le point de départ semble être un défaut d'invasion trophoblastique. Elle est considérée comme un trouble de l'angiogenèse placentaire et de la fonction endothéliale avec vasospasme. Un déséquilibre des facteurs placentaires angiogéniques et anti-angiogéniques, conduisant à une altération de l'invasion des artères spiralées par le trophoblaste lors de l'implantation et à une dysfonction endothéliale maternelle, semble être impliqué dans la PE (208). Ce défaut d'invasion trophoblastique est responsable d'une augmentation des résistances vasculaires, ce qui aboutit à une diminution du débit sanguin utéro-placentaire (209,210).

Du fait des implications décrites du système apelinergique à la fois dans l'angiogenèse et la

régulation de la tension artérielle, plusieurs études cliniques se sont intéressées à son activité en cas de PE. Sur le plan expérimental, une étude réalisée chez le rat a montré que l'HTA maternelle en fin de gestation, induite par le blocage de la synthèse de NO, est capable de moduler l'expression d'apeline et d'APJ dans le placenta et les tissus fœtaux, ce qui suggère une sensibilité fonctionnelle placentaire et prénatale de ce système à l'HTA maternelle (211).

Les études sur les taux plasmatiques d'apeline chez les femmes pré-éclamptiques ont donné des résultats contradictoires. Une étude a révélé une diminution des concentrations plasmatiques d'apeline, trois études ont révélé une augmentation et deux études ont montré des taux non affectés dans une petite cohorte de femmes PE (152) et chez des PE tardives (212). Dans l'étude de Bortoff, *et al.* qui est la seule qui rapporte une diminution des concentrations plasmatiques d'apeline en cas de PE, des échantillons de sang ont été prélevés à l'accouchement à 35,6 SA chez les mères PE, mais à 39,6 SA chez les patients normo-tendues (154). Dans la plupart des études, les taux plasmatiques d'apeline maternelle étaient mesurés peu de temps après le diagnostic de PE et avant l'accouchement, soit entre 30 et 36 SA chez les femmes atteintes de PE, alors que les prélèvements sanguins chez les mères témoins normotendues étaient souvent effectués plus tardivement, vers 35-39 SA. Cette différence significative d'âge gestationnel peut être un facteur de confusion pour conclure à un effet de la PE sur l'apelinémie maternelle car ce paramètre est modulé dynamiquement au cours de la grossesse. L'analyse placentaire pourrait également être affectée par ce phénomène. Dans l'étude d'Inuzuka, *et al.*, il a été montré une augmentation de l'apeline circulante (178). Les sérums et les biopsies placentaires ont été obtenues après la césarienne pour éviter les prétendus effets du travail et, en outre, les âges gestationnels entre les groupes étaient très proches avec 35,4 SA chez les témoins et 33,9 SA dans le groupe de prééclampsie sévère. Une telle augmentation des taux d'apeline circulantes ont été rapportés dans deux autres études (212,213) mais, malheureusement, dans ces trois études, seule l'apeline-36 avait été dosée dans le sérum rendant difficile de conclure sur la modulation de l'ensemble des isoformes de l'apeline dans le plasma. En outre, comme il existe plusieurs formes peptidiques moléculaires de l'apeline, certaines études ont uniquement porté sur l'apeline-36 (157,178) tandis que d'autres ont étudié toutes les isoformes moléculaires de l'apeline (146).

Bien qu'un plus grand nombre d'études soient menées pour essayer de répondre à certaines de ces questions, la PE semble déclencher la sécrétion d'apeline. Nous postulons que des taux élevés d'apeline pourraient être une réponse réactive à l'HTA maternelle selon l'idée que l'apeline pourrait stimuler la libération de NO permettant une vasodilatation pour réduire la résistance vasculaire chez

la mère et peut-être pour assurer une perfusion placentaire adéquate. L'origine de l'apeline au plasmatique reste inconnue. En cas de PE, plusieurs auteurs ont suggéré que l'élévation de l'apelinémie puisse impliquer le placenta et d'autres tissus maternels, tels que le tissu adipeux (152,178,212,213).

Dans le placenta, Nishizawa, *et al.* en utilisant une analyse de microarray des placentas PE ont révélé que l'apeline est l'un des gènes les plus significativement régulés négativement dans la PE (214,215). Hormis dans l'étude de Van Mieghem, *et al.* (152) qui étudiait une très petite cohorte de patientes et dans l'étude de Cobellis, *et al.* (155) qui a seulement étudié la distribution immunohistochimique de l'apeline et d'APJ, qui n'est pas très quantitative, les trois études cliniques restantes ont clairement démontré une diminution significative des concentrations de l'ARNm de l'apeline et de ses isoformes peptidiques dans les placentas PE. Le récepteur APJ n'était pas affecté dans deux études, augmenté en terme d'ARNm en cas de PE tardive dans une étude (176) et en terme d'immunoréactivité de l'APJ dans une autre (155). Cependant, dans cette dernière étude, les auteurs ont signalé la localisation nucléaire et cytoplasmique de l'APJ, ce qui est déroutant étant donné que l'APJ est un GPCR et devrait être localisé principalement sur la membrane plasmique. Au total, ces données suggèrent que le système apelinergique est régulé négativement dans les placentas de patientes PE. Dans une étude récente de Yamaleyeva, *et al.* (146) a montré que: 1 / (Pyr¹)apeline-13 était la forme prédominante de l'apeline dans les villosités chorales placentaires humaines, 2 / la PE réduisait la concentration d'apeline placentaire sans affecter celui de l'APJ, 3 / AT2 diminuait la sécrétion placentaire d'apeline via l'activation du récepteur AT1. Etant donné qu'en cas de PE la production placentaire d'AT2 est augmentée (146) et que celle de l'apeline est diminuée, on peut envisager que ces modifications soient impliquées dans le défaut de perfusion placentaire. Cette hypothèse suggère que l'apeline placentaire et AT2 soient des régulateurs négatifs impliqués dans la régulation locale du flux sanguin dans les villosités chorales. En outre, comme l'apeline et APJ sont également retrouvés dans les cellules musculaires lisses des artères fœtales dans le labyrinthe du rat, ce système pourrait également réguler les transports trans-placentaires d'oxygène et de nutriments par des actions sur le tonus vasculaire loco-régional. Dans cette continuité, nous avons démontré que l'administration intraveineuse d'apeline chez des rates gestantes augmentait le transport trans-placentaire du glucose sans affecter les transporteurs de glucose placentaire (102). Cet effet pourrait impliquer un effet vasodilatateur placentaire de l'apeline par la production de NO comme retrouvé dans le muscle de souris (51). Cependant, l'effet stimulant de l'apeline sur la production placentaire de NO reste à démontrer.

IV.2. Le diabète

Le diabète gestationnel (DG) est défini par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiquée pour la 1^{ère} fois au cours de la grossesse, quels que soient le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum. Sa prévalence est de 2 à 14% des grossesses dans le monde, selon l'origine ethnique et le test diagnostique utilisé (216). En France en 2010, il affectait entre 5 et 10% des grossesses (217). Le DG est responsable de nombreuses complications à court terme (macrosomie, PE (218), hypoglycémie néonatale, détresse respiratoire néonatale (219)) et à long terme (diabète de type 2 (DT2) et des maladies cardiovasculaires (220) chez la mère ; DT2, HTA, obésité et des pathologies cardiovasculaires chez l'enfant (221)).

Les mécanismes cellulaires impliqués dans le développement du DG ne sont pas complètement compris, mais les preuves cumulatives indiquent que les adipokines qui participent à divers processus métaboliques, y compris la sensibilité à l'insuline, le contrôle de l'appétit, l'adipogénèse et les réglementations énergétiques, pourraient contribuer à des changements dans l'homéostasie du glucose et la résistance à l'insuline provoquant le DG (220).

Chez les rongeurs, il est maintenant démontré que le système apelinergique contrôle l'homéostasie du glucose, la libération d'insuline et la sensibilité à l'insuline pendant la période néonatale et à l'âge adulte (51,102,222). Chez les humains, ces actions doivent encore être démontrées, mais elles sont probablement présentes car de nombreuses études ont rapporté des variations dans les concentrations plasmatiques d'apeline chez les sujets diabétiques (41). La plupart des études ont montré des concentrations d'apeline plus élevées chez les patients atteints de DT2 et, récemment, il a été démontré qu'il existait une corrélation négative entre les taux d'apeline et l'hémoglobine glycosylée chez les patients atteints de DT2 (223). Au total, ces données suggèrent que l'apeline jouerait un rôle dans l'équilibre glycémique et la sensibilité à l'insuline chez l'homme. En cas de diabète de type 1, les données sont plus controversées (224) mais les concentrations plasmatiques d'apeline semblent accrues chez les patients DT1 (223,225). Cependant, ces variations entre le DT1 et le DT2 peuvent s'expliquer par les différences dans la population étudiée (âge, IMC, durée du diabète et traitement de l'insuline).

Seules quatre études cliniques ont étudié la modulation de l'apelinémie dans les échantillons de sang maternel et de cordon dans les grossesses marquées par un DG et une seule a étudié la modulation du système de apeline / APJ au niveau placentaire. Dans l'étude d'Akinci et al., l'apelinémie a été

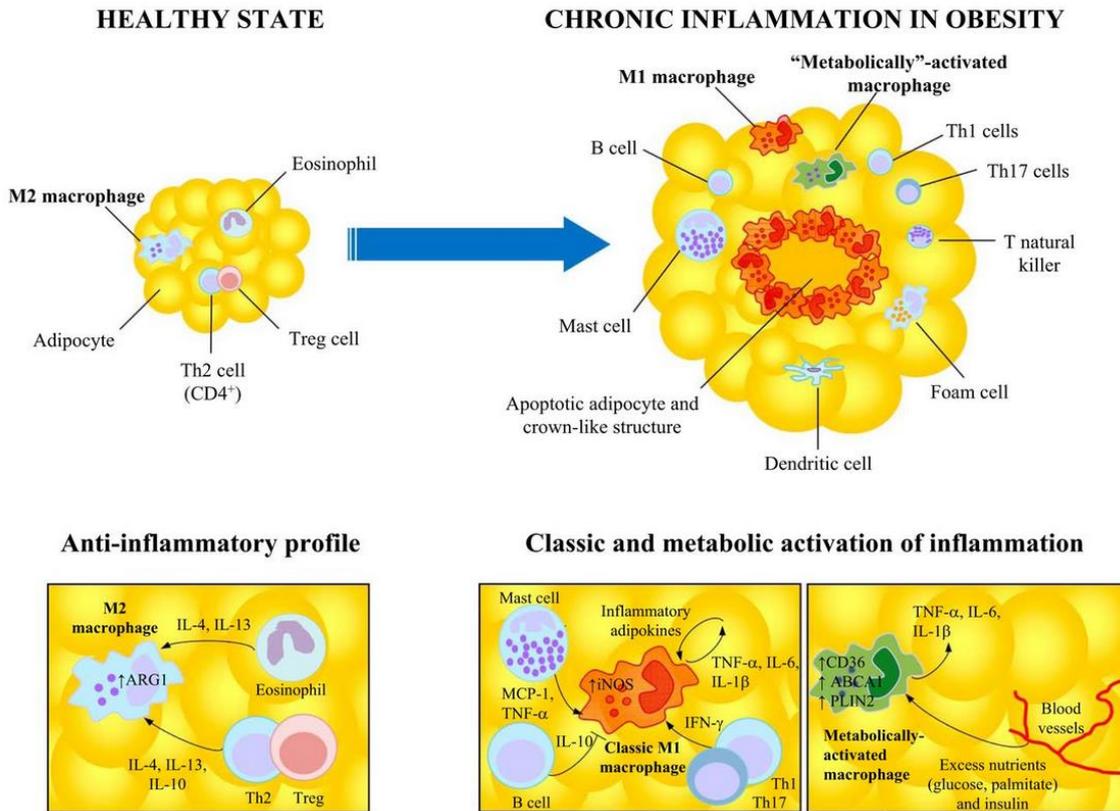
mesurée chez une grande cohorte de femmes trois ans après l'accouchement après DG (226). La diminution de l'apelinémie observée chez les femmes ayant un antécédent de DG pourrait être due à de nombreuses autres affections du post-partum et les facteurs rendant cette observation difficile à lier exclusivement au DG.

Dans le sang maternel et le sang de cordon, les résultats de l'apelinémie en cas de DG sont contradictoires. Deux études ont révélé que le taux d'apeline plasmatique maternelle n'était pas affecté par le DG (179,187), une étude a trouvé une augmentation (177) alors qu'une autre a montré une réduction (227) de ce taux. Dans les échantillons de sang de cordon, qui reflètent en partie l'apelinémie fœtale, une étude a trouvé une réduction (179) alors qu'une autre n'a observé aucun changement (177). Telejko, *et al.* a été le seul à étudier les expressions placentaires de l'apeline et d'APJ (187). Les auteurs n'ont pas trouvé de modulation de la quantité d'ARNm de l'APJ dans les placentas de femmes ayant un DG et aucune modification de l'apelinémie maternelle. Pour conclure, bien que ces données doivent être confirmées par d'autres études, il semble qu'en cas de DG, l'apelinémie soit modulée différemment en cas de résistance à l'insuline et d'hyperglycémie chronique chez les mères, alors que chez les femmes adultes non enceintes, l'apelinémie augmente en cas de diabète. Ainsi, la grossesse peut représenter un intervalle de temps spécifique où le taux d'apeline circulant peut être régulé d'une manière spécifique pour assurer un développement adéquat du placenta.

IV.3. L'obésité

L'obésité n'est pas une pathologie en tant que telle, mais plutôt une situation à risque accru de développer des pathologies. L'augmentation du tissu adipeux est responsable d'une dysfonction de celui-ci (adipopathie), dont la caractéristique principale est l'insulino- et la leptino-résistance, de même que la production de cytokines inflammatoires, TNF α et IL6 (228). Il se développe donc une inflammation chronique de faible intensité, contribuant de façon majeure au développement d'une insulino-résistance et d'un DT2. Il résulte de cette inflammation l'accumulation dans le tissu adipeux de macrophages de type M1, pro-inflammatoires, et de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α (229), la leptine ou la résistine, ainsi qu'une baisse de sécrétion des adipokines anti-inflammatoires comme l'adiponectine (28) (Figure 12). Au niveau du tissu adipeux, ces cytokines interfèrent avec la différenciation cellulaire, entraînant une dysfonction de l'adiponectine et de la leptine à ce niveau.

Figure 12 : Schématisation de l'inflammation du tissu adipeux (29).



IV.3.1. Obésité chez la femme enceinte

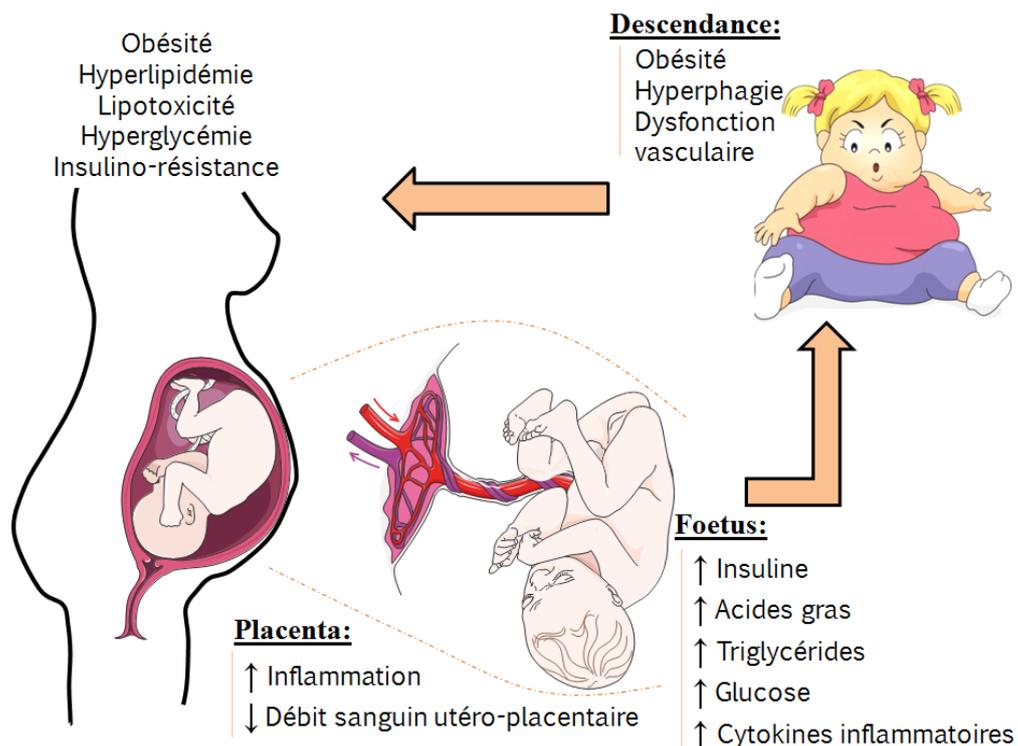
L'obésité affecte actuellement un nombre croissant de femmes en âge de procréer, ce qui aboutit à une forte prévalence de l'obésité pendant la grossesse. Au cours de la grossesse, l'obésité maternelle est associée à un risque accru de complications obstétricales telles que le DG, l'HTA, la PE, l'accouchement prématuré et l'augmentation de la morbidité et de la mortalité néonatales (230). En outre, l'obésité maternelle influence également les fonctions placentaires (231) et la croissance du fœtus entraînant souvent une macrosomie fœtale (232). A plus long terme, les mères obèses et leur enfant sont également enclins à développer des troubles cardiovasculaires et métaboliques (232).

Au cours de la grossesse normale, le métabolisme maternel est en faveur d'un stockage d'énergie dans le but de préparer des réserves pour l'allaitement. L'augmentation de l'insuline permet donc de favoriser le stockage d'acides gras libres sous forme de lipides. L'augmentation physiologique de la masse adipeuse est responsable d'une modification de la sécrétion des cytokines et des adipokines sécrétées par le tissu adipeux, aboutissant à une diminution de la sensibilité à l'insuline, une hyperlipidémie transitoire et une augmentation du stress oxydatif (145).

Chez la femme obèse, il existe une lipolyse chronique, responsable d'une insulino-résistance et d'une diminution de la production d'insuline. L'augmentation des acides gras libres favorise le développement d'une insulino-résistance et la diminution de la production d'insuline. Ce déséquilibre entraîne une réponse immunitaire innée et une activation des Toll-like récepteurs (TLR) et de la voie NFκB qui est un facteur de transcription pro-inflammatoire. Durant la grossesse, il a été suggéré que ces cytokines pro-inflammatoires pourraient altérer le transport placentaire de nutriments (170).

L'inflammation et l'insulinorésistance, physiologique au cours de la grossesse, voient leurs effets exacerbés par l'obésité. Ainsi, les femmes enceintes obèses ont des concentrations en cytokines, en lipides et en insuline plus élevées (145,170,233). Ces altérations peuvent devenir « toxiques » et entraîner des changements de la fonction placentaire et des modifications métaboliques fœtales. Les fœtus issus de mères obèses ont une adiposité plus importante, une glycémie et une insuliniémie supérieures, une insulino-résistance, des concentrations plasmatiques en leptine augmentées (233) et une inflammation systémique fœtale, aboutissant à une programmation de la descendance, avec un risque accru d'obésité et de développer un syndrome métabolique (Figure 13) (230,234).

Figure 13: Conséquences de l'obésité maternelle sur le développement du placenta et du fœtus (adapté de Frias et Groves, 2012 (170)). Réalisé à partir de la banque d'images Servier Médical Art (128).



Chez les femmes enceintes obèses, les concentrations plasmatiques en cytokines sont modifiées par rapport aux femmes enceintes non obèses (146). Ainsi, la leptine, adipokine la plus étudiée, augmente au cours des 2 premiers trimestres de la grossesse et présente un pic de concentration dans le plasma à la fin du 2^{ème} trimestre de la grossesse. Son taux reste élevé au cours du 3^{ème} trimestre puis chute dans le post-partum, suggérant un rôle important de cette adipokine au cours de la grossesse (235). Les autres adipokines présentent également des variations au cours de la grossesse, telle que l'apeline.

IV.3.2. Apeline et obésité au cours de la grossesse

En dehors de la grossesse, les taux d'apeline circulants sont augmentés chez les femmes obèses (25 vs 12 pg/100µL) (48). Il a été montré qu'un régime hypocalorique associé à une perte de poids permettait de réduire ces taux (110). Dans cette étude, la diminution du taux plasmatique d'apeline était associée à une diminution de l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux, suggérant que le TA soit un régulateur clé des taux d'insuline plasmatique en cas d'obésité.

Au cours de la grossesse, chez des individus de poids normal, plusieurs auteurs ont montré qu'il y avait une diminution de l'apelinémie en fin de gestation, que ce soit chez l'animal (102,150) ou chez la femme (152,236).

Chez la femme obèse, le fœtus présente souvent une accélération de sa croissance (macrosomie), voire une diminution de celle-ci (RCIU) (232). Dans de précédents travaux, notamment sur la prééclampsie, plusieurs auteurs avaient suggéré que l'apeline puisse être un marqueur prédictif des troubles de la croissance fœtale (97,152,176–178,237). Toutefois, les études sur l'humain sont très contradictoires et l'apeline semblait surtout être un marqueur du RCIU plutôt que de la macrosomie.

A l'heure actuelle, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée au système apeline / APJ au cours de la grossesse chez les femmes obèses. Dans la suite de cette thèse, nous allons essayer de décrire les modulations du système apelinergique chez la femme enceinte obèse.

Au total, le rôle de l'apeline au cours de la grossesse et en particulier chez la femme enceinte obèse est encore mal connu. Elle pourrait présenter un intérêt sur le plan thérapeutique puisqu'il a été montré qu'en dehors de la gestation, une injection d'apeline chez la souris obèse et insulino-résistante permettait d'améliorer l'insulino-sensibilité, de diminuer l'insulinémie, l'adiposité et le poids corporel et permettait d'améliorer l'utilisation périphérique du glucose par le muscle (41). Elle pourrait également être intéressante au cours de la grossesse, au moment où le fœtus programme son futur métabolisme. Cependant, avant d'envisager l'utilisation de l'apeline comme thérapeutique, la première étape consiste à améliorer la compréhension de l'implication du système apelinergique chez la femme enceinte obèse.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Dès la conception, l'organisme présente des caractéristiques qui dépendent de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Les héritages génétiques maternels et paternels et l'environnement utérin (diabète, obésité, insuffisance placentaire, stress) sont les premiers facteurs à intervenir dans la croissance du fœtus. S'ajoutent ensuite des facteurs environnementaux au cours de la croissance précoce (allaitement maternel, nutrition) et à l'âge adulte (nutrition, activité physique...).

Le but de nos travaux était de mieux comprendre les mécanismes anténataux impliqués dans la programmation des complications métaboliques dues à l'obésité maternelle en étudiant une hormone de découverte récente potentiellement intéressante dans cette programmation, l'apeline.

Ainsi, l'objectif de cette thèse était d'étudier les modifications du système apelinergique en cas d'obésité au cours de la gestation.

A l'aide d'un **modèle animal de souris gestantes obèses et insulino-résistantes**, nous étudierons les modifications du système apelinergique en cas d'obésité au cours de la gestation, tout d'abord au niveau plasmatique, chez la souris et son souriceau, puis au niveau placentaire, en étudiant l'expression de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ, et la sécrétion placentaire *ex-vivo* de l'apeline.

Ensuite, nous vérifierons si les modifications du système apelinergique observées au cours de la gestation chez la souris obèse étaient retrouvées chez la **femme enceinte obèse (étude OB-APE)**. Nous étudierons les taux plasmatiques d'apeline, chez la mère et son enfant, puis au niveau placentaire l'expression de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ, ainsi que la sécrétion placentaire *ex-vivo* de l'apeline, et enfin les concentrations en apeline dans le colostrum.

1ère PARTIE

MODELE ANIMAL

De nombreuses données dans la littérature mettent en évidence des effets positifs de l'apeline sur l'organisme, notamment chez l'individu obèse. D'autre part, il a été montré que le système apelinergique était modifié au cours de la gestation (76,150,153). A notre connaissance, aucune étude ne s'était intéressée aux modulations du système apelinergique en cas d'obésité chez l'individu obèse.

Pour déterminer si le système apelinergique était modulé par l'obésité au cours de la gestation, nous avons mené une étude expérimentale comparant des souris normales et des souris obèses et insulino-résistantes nourries avec un régime hypercalorique, hyperlipidique et hyperlipidémique.

L'objectif de cette première partie était d'étudier les modifications du système apelinergique en cas d'obésité au cours de la gestation chez la souris gestante obèse et insulino-résistante.

Pour cela, nous avons étudié les modifications du système apelinergique en cas d'obésité au cours de la gestation, au niveau plasmatique (chez la souris et son souriceau) et au niveau placentaire (expression de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ, sécrétion placentaire *ex-vivo* de l'apeline).

MATERIELS ET METHODE

MODELE MURIN

I. Modèle animal : Souris obèse et insulino-résistante

I.1. Souris

Les différentes étapes du protocole de la phase animale ont été réalisées au DHURE (Département Hospitalo-Universitaire en Recherche Expérimentale), pôle recherche de la faculté de médecine Henri Warembourg Université Lille 2, et sont en accord avec les principes de soins des animaux de laboratoire de l'UE (European communities council directive of 2010, 2010/63/UE). Quarante souris femelles C57Bl/6J (éleveur Janvier, Genest-St-Isle) ont été livrées à 4 semaines de vie, élevées à température ambiante ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), à raison de 5 souris par cage, et soumises à un éclairage artificiel de 10 heures / 24. Dix souris mâles ayant les mêmes caractéristiques que les femelles ont été reçues à 6 semaines. Les souris femelles ont été pesées de façon bihebdomadaire durant toute la durée de l'expérimentation et de façon quotidienne durant la phase de reproduction.

I.2. Aliments

Les souris femelles avaient un accès libre à l'alimentation et à l'eau. Elles ont été randomisées en 2 groupes et le régime a été maintenu pour une durée de 12 semaines (Tableau 2) :

1. 20 souris femelles ont suivi un régime standard, normo-calorique (groupe Témoin ou T).
2. 20 souris femelles ont suivi un régime hypercalorique, hyperlipidique et hyperglucidique (High Fat ou HF), comprenant 45% de graisses, 35% d'hydrates de carbone et 20% de protéines.

Tableau 2 : Composition des Régimes Normo-Calorique (T) et High Fat (HF)

	Régime Normo-Calorique (T)			Régime High Fat (HF)		
	% matière sèche	kcal / g	% (kCal)	% matière sèche	kcal / g	% (kCal)
Lipides	3.9	0.35	7.2	26.5	2.4	44.8
Protéines	20.4	0.81	19.5	26.9	1.1	20.2
Glucides	75.7	3.03	72.3	46.6	1.9	35.0
TOTAL		2.79	100.0		4.54	100.0

I.3. Evaluation de la prise alimentaire

Les croquettes ont été pesées de façon biquotidienne, à 8h et à 18h, 8 jours consécutifs et la quantité moyenne de croquettes consommée par chaque souris a été calculée.

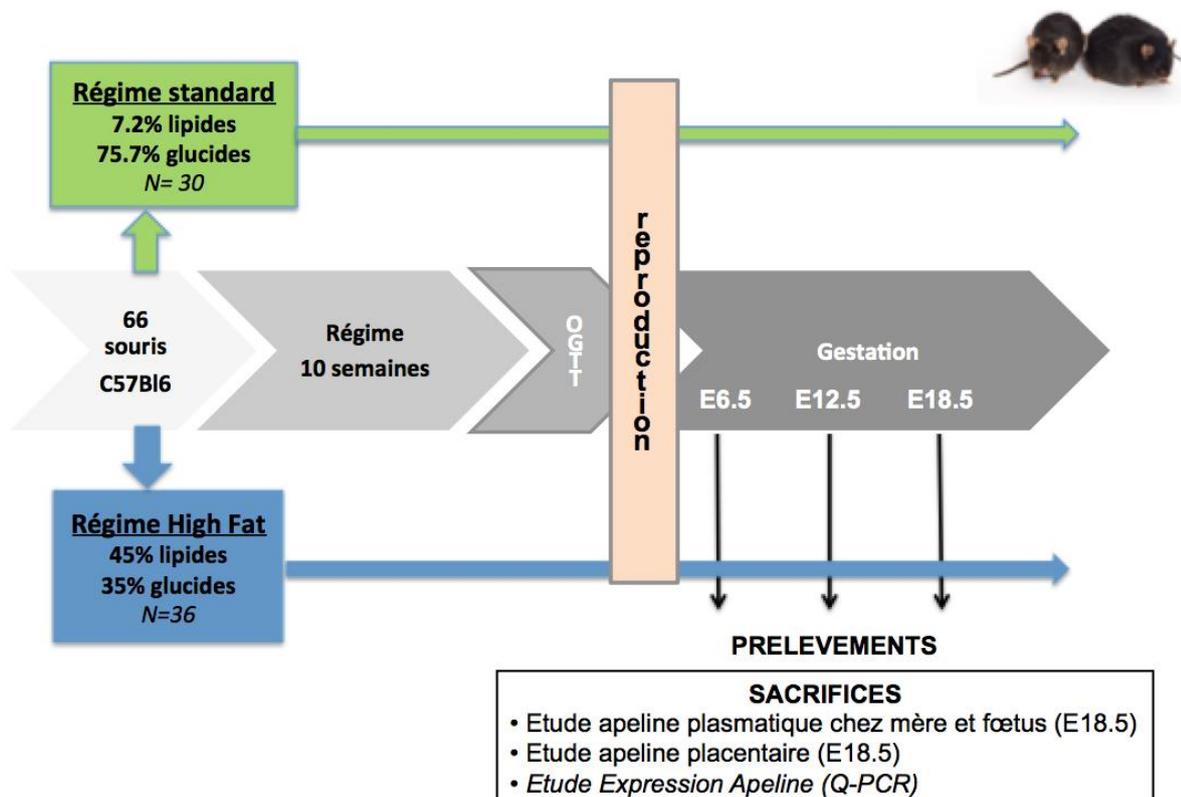
I.4. Reproduction

Des frottis vaginaux étaient réalisés afin de déterminer avec précision le jour de l'œstrus. Vingt souris femelles Témoins et 20 souris HF ont été placées avec les mâles, à raison de 2 souris femelles par mâle, de 18h à 8h. La présence d'un bouchon vaginal le lendemain à 8h signalait l'accouplement et les femelles étaient donc considérées à E0.5. En cas de fécondation, un prélèvement sanguin était réalisé à jeun à E6.5, E12.5 et E18.5 (Figure 14). En l'absence de fécondation, confirmée par l'absence de prise de poids 15 jours après le coït (238), les souris étaient remises en reproduction selon le même protocole.

A E18.5, les souris étaient sacrifiées par décapitation après anesthésie à l'isoflurane après 6 heures de jeûne. Du sang était ainsi recueilli dans des tubes contenant 20 µL d'EDTA. Les fœtus et les placentas étaient pesés. Les souriceaux étaient sacrifiés par décapitation et du sang était récupéré et regroupé par portée pour doser l'apelinémie. Les placentas étaient conservés dans du RNA Later puis stockés à -18°C.

Les organes de la mère (tissu adipeux blanc (périrénal et périgonadique) et brun, cœur, reins, poumons, hypothalamus, hypophyse, ovaires) ont été prélevés, pesés et conservés dans du RNA Later pendant 48 heures puis congelés à -18°C.

Figure 14 : Schéma de l'étude sur la souris



I.5. Techniques

I.5.1. Collections biologiques

I.5.1.1. Frottis vaginaux

Les frottis vaginaux étaient réalisés selon la technique décrite par *McLean, et al.* (239). Ainsi, afin d'écartier une éventuelle influence du cycle œstral, nous avons réalisé avant mise en reproduction des souris un lavage vaginal et les gouttes recueillies ont été étalées sur des lames puis séchées à l'air libre. Les lames étaient ensuite colorées par du crystal violet à 0.1% puis elles étaient analysées au microscope (X40). L'apelinémie a ensuite été mesurée 4 jours consécutifs (durée moyenne du cycle œstral murin) à 8 h, chez des souris nourries *ad libitum*, en réalisant simultanément un frottis vaginal.

I.5.1.2. Plasma

Les prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau de la veine caudale des souris. Le sang était centrifugé puis le plasma était récupéré et stocké à -80°C.

I.5.1.3. Placenta

Les placentas étaient recueillis par césarienne et disséqués pour éliminer les membranes, puis rincés dans du sérum salé isotonique (SSI) à 9‰. Chaque placenta était coupé en deux, une moitié étant mise dans du RNA later, l'autre dans de l'azote liquide. Les échantillons étaient conservés à -80°C.

I.5.2. Dosages biologiques

I.5.1. Test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT)

A l'issue des 3 mois de régime, une OGTT a été réalisée. L'absorption d'une dose de 2g/kg de glucose a été réalisée par gavage après 6h de jeûne. Un prélèvement sanguin était réalisé 30 minutes avant le gavage (T-30) au niveau de la veine caudale et le plasma était congelé à -80°C. La glycémie était mesurée à T-30, au moment du gavage (T0), puis 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes après le gavage. Le degré d'insulino-résistance était estimé par l'HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance) = glycémie à jeun (mg/dL) X insulïnémie à jeun (μ U/L) / 405 (240).

I.5.2. Dosages hormonaux

I.5.2.1. Dosage des glycémies et de l'insulinémie

Les glycémies ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de glycémie de type Accu-Chek Performa (Roche). L'insulinémie a été dosée par ELISA (10-1247-01, Mercodia, Uppsala, Sweden).

I.5.2.2. Dosage de l'apeline

Les dosages de l'apeline dans les plasmas maternel et néonatal ont été réalisés par technique immunoenzymatique (EKE-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA). Les dosages dans le colostrum ont été réalisés à l'aide du même kit, après vérification de l'absence d'effet d'inhibition.

Les concentrations ont été calculées à partir des absorbances, lues à 450nm, obtenues par spectrophotométrie (Bio-Rad), à l'aide de courbes standards avec le logiciel «Myassays.com».

I.5.3. Sécrétions placentaires d'apeline

Chaque prélèvement placentaire destiné aux sécrétions était rincé dans du sérum salé isotonique à 9‰ puis mis dans des boîtes de pétri contenant 2ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco). Dans la 1^{ère} boîte, aucun additif n'était ajouté. Dans la 2^{ème} boîte était ajouté 50nM d'insuline (48) et dans la 3^{ème}, 1nM d'AT2 (241). Ces plaques étaient placées à 37°C avec 95% d'O₂, 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Un échantillon de 200µL du milieu était prélevé après 2, 6 et 12 heures d'incubation, puis un dosage était réalisé par ELISA (référence EK-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA), après vérification de l'absence d'effet d'inhibition.

I.5.4. Expression placentaire de l'ARNm de l'apeline et d'APJ

Chaque prélèvement placentaire destiné à l'étude de l'expression était rincé dans du sérum salé isotonique à 9‰ puis mis dans du RNA later pendant 24 heures à 4°C puis était conservé à -80°C. Les méthodes d'analyse par RT-qPCR ont été précédemment décrites (242). Les RT-qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur (LightCycler 480, Roche, France). Nous avons utilisé des amorces pré-validées pour les gènes de l'apeline et d'APJ (GT00047775 et QT00221592, QuantiTect Primer Assays, Qiagen). Les RT-qPCR étaient réalisées en utilisant une solution de master mix SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, France). Les amorces pour apeline, APJ, les gènes d'intérêt et les gènes de ménage (GAPDH et β -actin) sont reportées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR, chez la souris (46).

Espèces	Gènes	Séquences	
		Sens	Anti-sens
Souris	Apeline	TGTGGAGTGCCACTGATGTTGCC	GGGGGCGCTGTCTGCGAAAT
	APJ	GGCTAAGGCTGCGAGTCA	GCGTCTGTGGAACGGAAC
	β -actin	ACCCGCCACCAGTTCGCCAT	TTTGACATGCCGGAGCCGT
	GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	CACCACCTTCTTGATGTCATCATAC

I.5. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 7® (GraphPad Software, INC., La Jolla, CA, USA). Les variables qualitatives sont exprimées en pourcentages (n (%)) et celles quantitatives sous la forme de moyenne \pm ESM (écart standard à la moyenne). Les analyses statistiques utilisaient les tests de Student et d'ANOVA (One-Way ou Two-Way) suivi d'un Newman-Keuls en test post-hoc. Le seuil de significativité retenu était $p < 0,05$. Dans les figures, la significativité des résultats sera notée par * si $P < 0,05$, ** si $P < 0,01$, *** si $P < 0,001$.

RÉSULTATS

MODELE MURIN

☞ Validation des conditions de dosage de l'apelinémie chez la souris

Dans l'organisme, les hormones sont soumises à l'influence de différents paramètres. Ainsi, Boucher, et al. avait montré que l'apelinémie variait en fonction du statut nutritionnel de l'individu (46,48). *In vivo*, le jeûne réduit les taux plasmatiques d'apeline, qui sont ensuite restaurés par la réalimentation (46,48,243). Ces variations de l'apelinémie se font parallèlement à celles des taux plasmatiques d'insuline (48). Il semble donc important de tenir compte du statut nutritionnel de l'individu avant de réaliser ce dosage hormonal.

D'autres facteurs régulent la production hormonale, tel que le rythme circadien. La quasi totalité des hormones et des fonctions de l'organisme sont soumises à ce rythme. Ainsi, Boucher, *et al.* avait montré chez la souris mâle que les taux plasmatique d'apeline suivaient un rythme circadien avec une augmentation pendant la période sombre, correspondant à la période d'alimentation des rongeurs (99).

Dans notre étude sur le modèle murin, nous avons utilisé des souris femelles. Les femelles sont moins souvent utilisées dans les études que les mâles, car elles sont soumises à un autre rythme, le cycle œstral, qui pourrait potentiellement avoir une influence sur les dosages hormonaux.

Avant d'étudier le système apelinergique chez la souris obèse et insulino-résistante, nous avons voulu vérifier si ces différents facteurs influaient sur le dosage de l'apelinémie afin de définir quelles étaient les conditions optimales de réalisation de nos prélèvements.

Nous avons donc évalué les variations du système apelinergique en fonction :

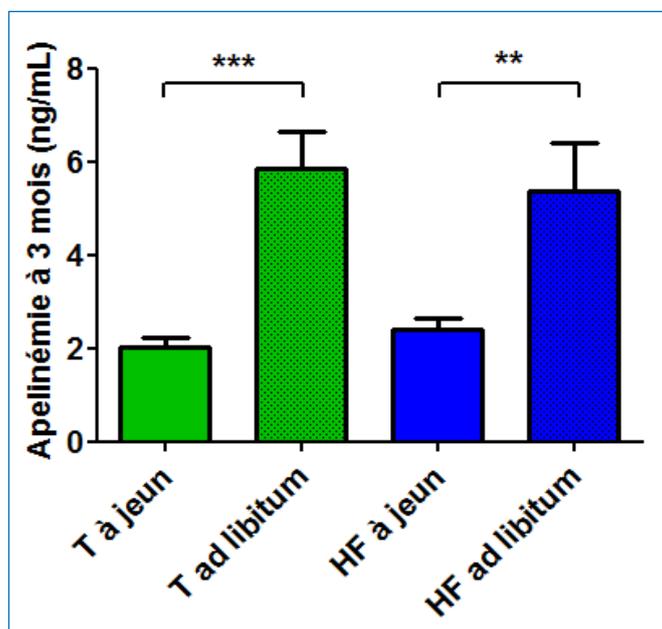
- 1. de l'état nutritionnel sur l'apelinémie,**
- 2. du rythme circadien avec une étude menée sur 24 heures,**
- 3. du cycle œstral chez les souris femelles.**

❖ Influence de l'état nutritionnel sur l'apelinémie

Après 3 mois de régime, nous avons réalisé des dosages de l'apelinémie dans les 2 groupes, T et HF, chez des souris nourries *ad libitum* et chez des souris à jeun depuis 6 heures. Les prélèvements étaient réalisés à 8 heures du matin, à la fin de la phase noire. Ils étaient réalisés au niveau de la veine caudale des souris.

L'apelinémie était significativement diminuée après 6 heures de jeûne dans les 2 groupes (T : $p < 0.001$ et HF : $p < 0.01$) (Figure 15). Les taux d'apeline plasmatique chez les souris nourries *ad libitum* étaient 2 à 3 fois supérieurs à ceux réalisés à jeun.

Figure 15 : Apelinémie à 3 mois à 8 heures chez les souris T et HF, à jeun et *ad libitum* (T : $n=30$; HF : $n=30$). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.



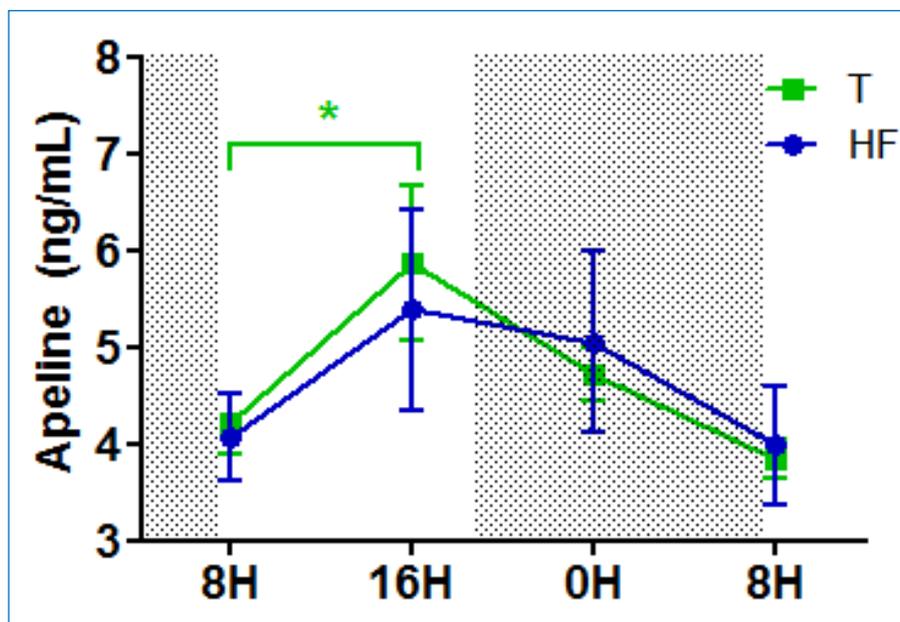
Au vue de ces résultats et en tenant compte du fait que l'apelinémie varie en fonction de l'insulinémie, nous avons choisi de réaliser l'ensemble des prélèvements chez des souris à jeun.

❖ Etude de l'influence du rythme circadien sur les dosages de l'apelinémie

Le fonctionnement de l'organisme est soumis à un rythme biologique, calé sur un cycle de 24 heures. La quasi totalité des fonctions biologiques de l'organisme sont soumises à ce rythme, dont la production hormonale. Duparc, *et al.* avait montré que l'apeline était soumise à un rythme nyctéméral chez la souris mâle, en rythme inversé (99). Dans notre étude, afin de pouvoir étudier la gestation, nous avons utilisé des souris femelles, non soumises à un rythme inversé. Nous avons donc voulu vérifier si, chez les souris femelles en rythme non inversé, l'apelinémie variait également selon le rythme circadien et si tel était le cas, vérifier à quel moment de la journée les prélèvements devaient être réalisés.

Nous avons dosé l'apelinémie toutes les 8 heures pendant 24 heures, soit à 8h, 16h, 0h et 8h, chez des souris âgées de 17 semaines et nourries *ad libitum*. Il y avait chez les souris Témoins un pic d'apelinémie à 16h, relativement modéré. Ce pic n'était pas retrouvé chez les souris du groupe HF, même si on pouvait observer la même tendance (Figure 16). Il n'y avait pas de différence significative d'apelinémie entre les 2 groupes, quelle que soit l'heure du prélèvement.

Figure 16 : Rythme circadien de l'apelinémie chez les souris femelles âgées de 18 semaines (T : n=30 ; HF : n=30). * P<0.05



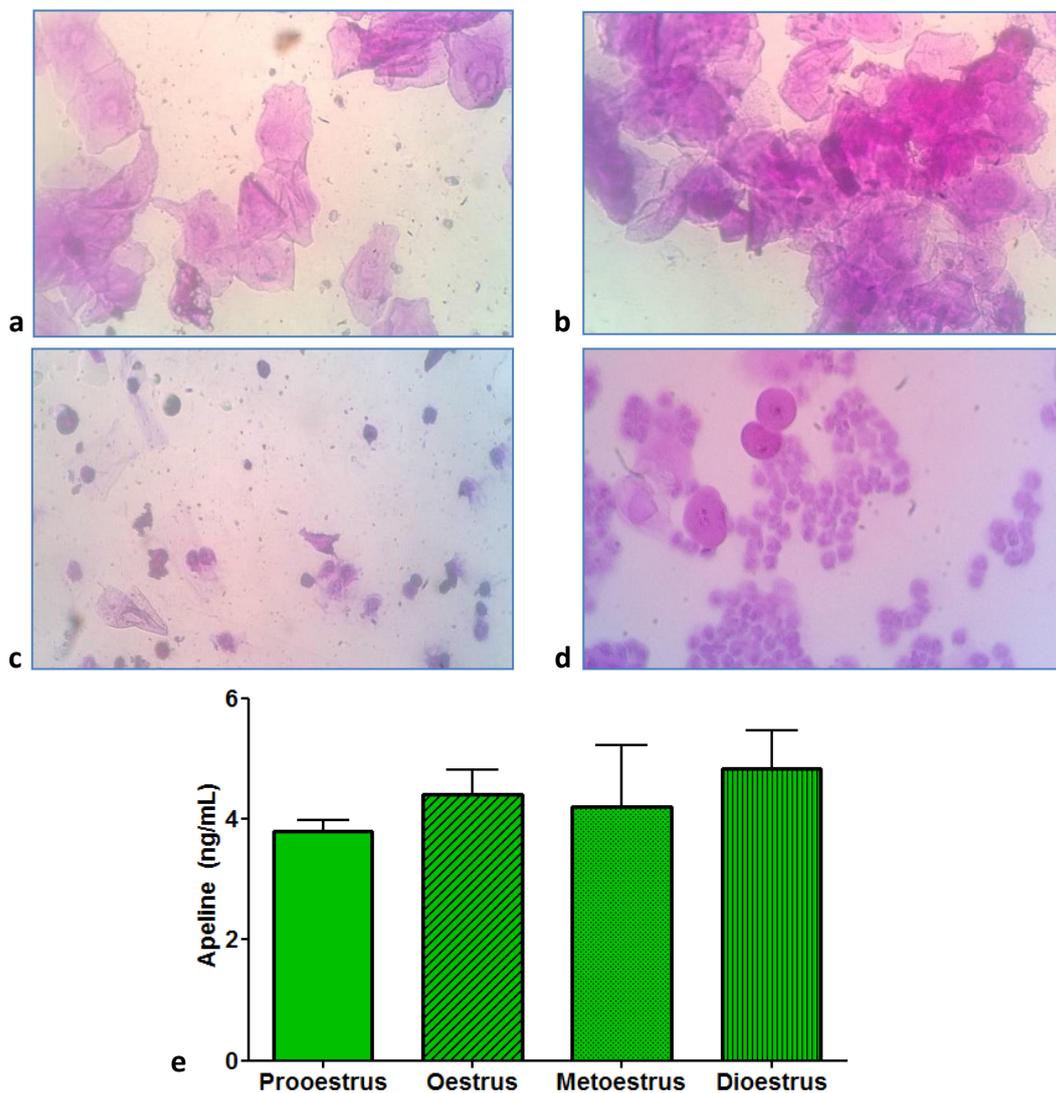
Le taux basal d'apeline semblait correspondre à 8 heures du matin, horaire auquel les valeurs des dosages présentaient les taux les plus faibles et le plus petit écart standard à la moyenne entre les individus.

❖ Influence du cycle œstral chez les souris femelles

Afin de vérifier s'il existe une influence du cycle œstral sur l'apelinémie, nous avons mesuré l'apelinémie 4 jours consécutifs (durée moyenne du cycle œstral murin), chez des souris non gestantes nourries *ad libitum*, en réalisant simultanément un frottis vaginal (Figures 17a-d).

Les taux d'apeline plasmatique n'étaient pas modifiés au cours du cycle œstral (Figure 17e).

Figures 17 a-e : Frottis vaginaux colorés au crystal violet (X40) ; a : proœstrus ; b : œstrus ; c : metœstrus ; d : diœstrus ; e : apelinémie selon la période du cycle œstral (T : n=30 ; HF : n=30).



Au vu de ces résultats, nous avons choisi d'effectuer l'ensemble des prélèvements de notre étude à heure fixe, à 8 heures du matin, chez des souris à jeun depuis 6 heures, sans tenir compte de leur période du cycle œstral.

☞ Validation du modèle d'obésité induit par un régime hypercalorique hyperlipidique chez la souris

Avant de s'intéresser à l'apelinémie, nous avons voulu vérifier que le régime auquel étaient soumises les souris du groupe HF était bien obèses, c'est-à-dire qu'elles avaient une augmentation du poids corporel et que cette prise de poids était bien liée à une augmentation du tissu adipeux.

De nombreux modèles d'obésité existent dans l'espèce animale. Il existe des modèles génétiques et des modèles induits par un régime HF. Les modèles animaux d'obésité impliquant une mutation génétique sont principalement développés chez les rongeurs. Chez la souris, une mutation du gène agouti (souris agouti Ay), du gène codant la leptine (souris ob/ob pour « obèse ») ou de son récepteur (souris db/db pour « diabète ») sont responsables d'une obésité, d'une intolérance au glucose et d'un diabète. Ces modèles sont des outils intéressants pour étudier les paramètres impliqués dans l'établissement de l'obésité et du diabète et dans les pathologies qui y sont associées mais ces mutations du gène de la leptine sont rares chez l'Homme et l'étude de ces modèles n'est probablement pas la plus représentative de la physiologie humaine.

Un second modèle d'obésité chez la souris est l'obésité induite par un régime alimentaire hypercalorique enrichi en graisses et en hydrates de carbone (244). Ce modèle se rapproche plus du régime « cafétéria », principal facteur impliqué dans la prise de poids dans l'espèce humaine.

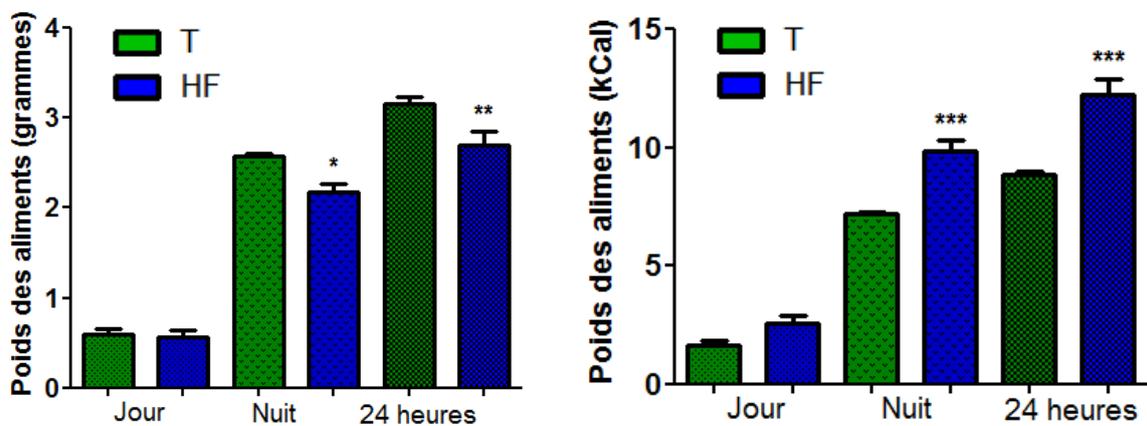
Nous avons soumis des souris C57Bl/6J femelles à un régime hypercalorique hyperglucidique et hyperlipidique afin de les rendre obèses et insulino-résistantes. Nous avons ensuite évalué leur poids corporel, leur prise alimentaire, leur glycémie, leur insulinoémie, et le poids de leurs différents organes, afin de vérifier si le régime High Fat (HF) était responsable d'une obésité chez les souris.

Résultats

Prise alimentaire

Les souris du groupe HF consommaient moins de croquettes en quantité que les souris Témoins, mais leur ration calorique quotidienne moyenne était plus élevée (Figures 18a-b).

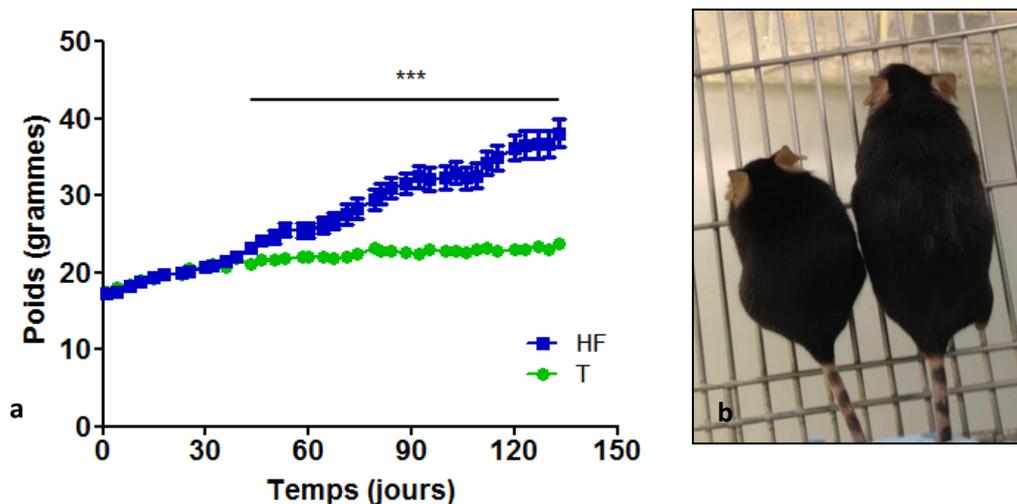
Figures 18 a-b : 4.a : Prise alimentaire en grammes de croquettes par souris ; 4.b : Prise alimentaire en kilocalories par souris (T : n=30 ; HF : n=30). * P<0.05 ; ** P<0.01 ; *** P<0.001.



Courbes de poids

Les souris HF ont vu leur poids corporel augmenter plus rapidement que les souris T et cette différence devenait significative dès le 40^{ème} jour de régime (Figures 19a-b). Un plateau était atteint après 40 jours chez les souris T alors que les souris HF poursuivaient leur prise de poids.

Figures 19 : a : Poids des souris selon leur régime alimentaire ; b : Photographie d'une souris T (à gauche) et d'une souris HF (à droite) après 2 mois de régime (T : n=30 ; HF : n=30). *** P<0.001.



Paramètres morphologiques

En fin de gestation, les souris HF, avaient une augmentation non significative de leur poids corporel comparativement au groupe T (P=0.11) (Tableau 4). Les dépôts de graisse péri-rénal, péri-gonadique et brun étaient augmentés et les poumons, le foie et les reins étaient plus lourds chez les souris HF.

Tableau 4 : Paramètres morphologiques après 6 heures de jeûne chez les femelles âgées de 27 à 30 semaines à E18.5. * P < 0.05.

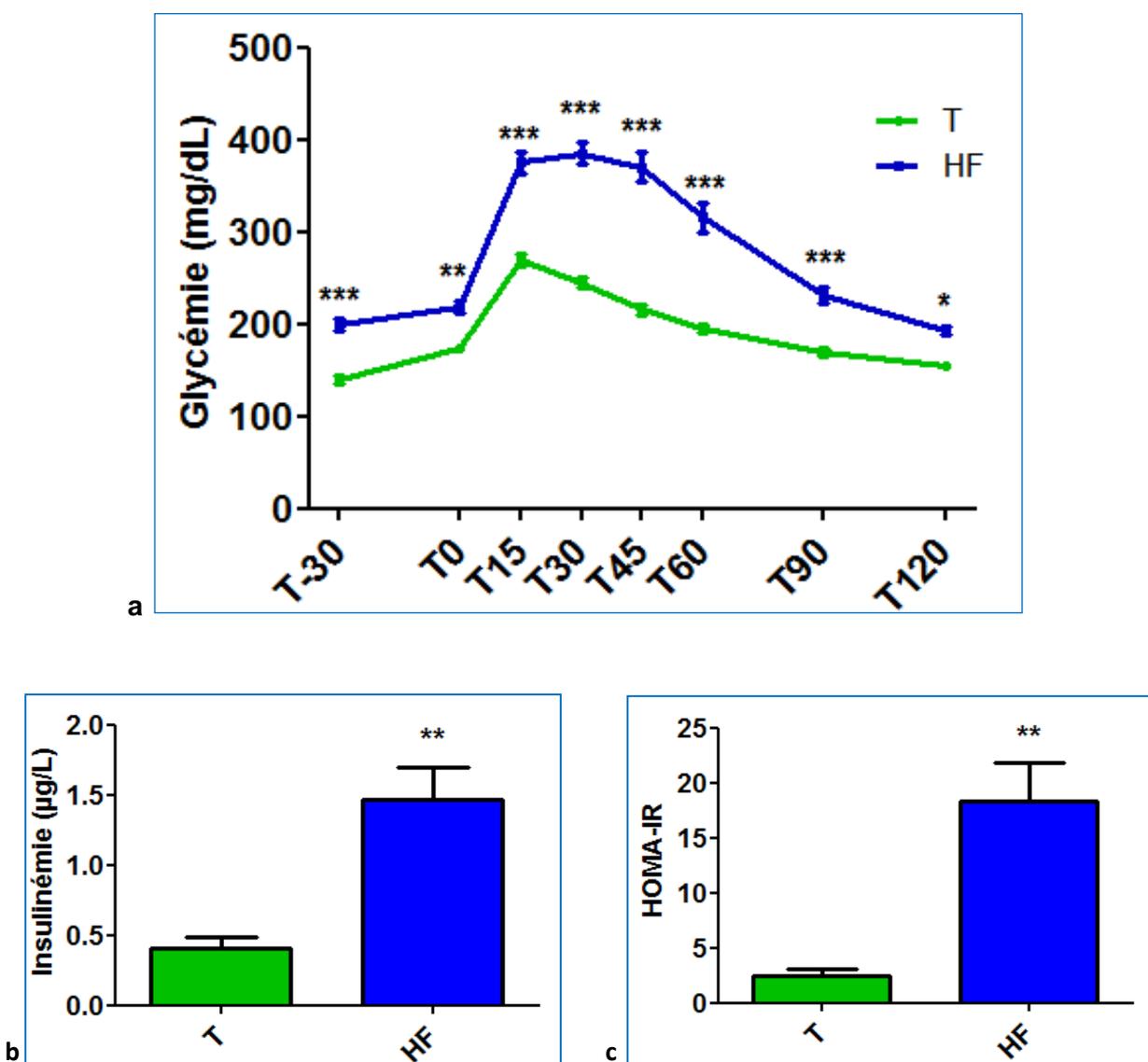
	T (n=30)	HF (n=30)
Poids corporel (grammes)	36.3 ± 2.7	45.9 ± 5.9*
Tissu adipeux péri-rénal (mg)	18.9 ± 2.3	43.1 ± 7.6**
Tissu adipeux péri-gonadique (mg)	21.9 ± 2.1	49.7 ± 6.7***
Tissu adipeux brun (mg)	8.6 ± 0.6	11.0 ± 0.8*
Cœur (mg)	13.9 ± 0.3	14.1 ± 0.3
Poumons (mg)	16.1 ± 0.4	17.6 ± 0.6*
Foie (mg)	129.3 ± 11.8	158.8 ± 7.9*
Reins (mg)	29.2 ± 0.5	33.3 ± 0.7**
Surrénales (mg)	4.7 ± 2.0	4.6 ± 1.3
Ovaires (mg)	7.9 ± 2.7	6.7 ± 1.7

Valeurs en moyenne ± E.S.M. * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001 ; groupe HF vs T.

Paramètres biologiques : insulino-résistance

Après 3 mois de régime, la glycémie à jeun était augmentée dans le groupe HF ($P < 0.001$), la glycémie s'élevait davantage après une charge de glucose (OGTT) comparé au groupe Témoin et mettait plus de temps à rejoindre les valeurs initiales (Figure 20 a). Les souris HF avaient une insulinoémie à jeun ($P < 0.01$) (Figure 20 b) et un HOMA-IR augmentés ($P < 0.01$) (Figure 20 c).

Figures 20 a-c : a : Glycémie lors de l'OGTT ; b : insulinoémie à jeun (T-30) ; c : HOMA-IR chez les souris des groupes T et HF après 3 mois de régime (T : n=30 ; HF : n=30). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.



❖ Apelinémie chez la souris obèse, hors contexte de gestation

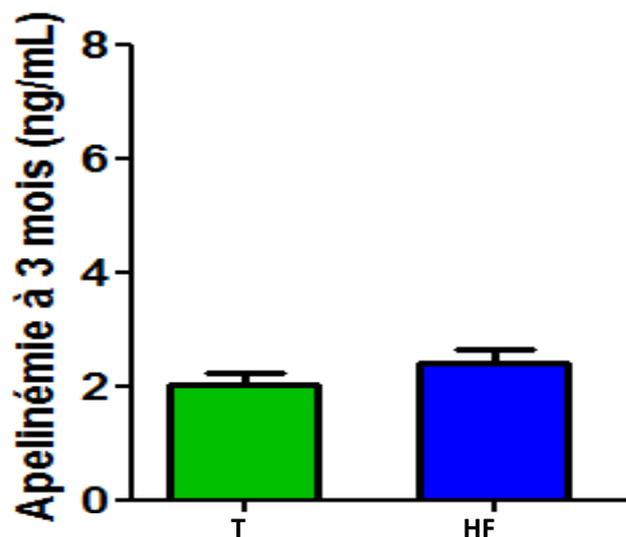
L'apeline pourrait être une hormone bénéfique pour l'organisme. Chez l'Homme et chez le rongeur, la plupart des auteurs ont montré qu'il existait une augmentation des taux d'apeline plasmatique en cas d'obésité (48,90,129,131). Toutefois ces résultats sont controversés (132). Nous voulions dans cette partie vérifier s'il y avait une modification de l'apelinémie chez nos souris obèses et insulino-résistantes.

Avant de mettre les souris de notre étude en reproduction, nous avons voulu vérifier s'il y avait une différence d'apelinémie entre les groupes T et HF afin d'étudier plus précisément les modulations plasmatiques de cette hormone au cours de la gestation.

Résultats

Dans notre étude sur des souris obèses et insulino-résistantes, il n'y avait pas de différence significative d'apelinémie chez les souris femelles en dehors de la gestation (Figure 21).

Figure 21 : Apelinémie à 3 mois chez les souris T et HF (T : n=30 ; HF : n=30).



☞ **Modulations de l'apelinémie chez la souris obèse et chez son souriceau au cours de la gestation**

Peu d'études se sont intéressées au système apelinergique au cours de la grossesse chez la femme. Kourtis, *et al.* a montré que chez la femme au 2^{ème} trimestre de la grossesse, il y avait une hypoapelinémie en comparaison avec des femmes non enceintes (diminution de 10% des concentrations circulantes) (76). L'apelinémie néonatale est supérieure à l'apelinémie maternelle au moment de la naissance (97), laissant suggérer un rôle de l'apeline dans le développement fœto-placentaire. Chez le nouveau-né, le tissu adipeux ne serait pas la principale source de l'apeline, mais celle-ci proviendrait plutôt du placenta.

Chez la rate gestante, il a été mis en évidence une diminution de l'apelinémie à E22 (à terme), qui pourrait être en lien avec une augmentation de la clairance de l'apeline par ACE 2 dont l'activité placentaire est doublée en fin de gestation (150).

Dans cette partie, nous souhaitons vérifier si l'apelinémie était modifiée au cours de la gestation chez la souris obèse et à terme chez le souriceau.

Résultats

Caractéristiques de la gestation

Il semblait y avoir un allongement du délai nécessaire pour concevoir et une diminution du nombre de souriceaux dans le groupe HF, même si cette différence n'était pas significative du fait de notre faible effectif (Tableau 5).

On ne notait pas de différence de glycémie à jeun entre nos 2 groupes, mais il y avait une tendance à l'augmentation de l'insulinémie à jeun et de l'HOMA-IR dans le groupe HF.

Il y avait une diminution du poids corporel des souriceaux issus de mères HF et une augmentation du poids de leurs placentas en comparaison avec le groupe T. Le ratio poids du souriceau / poids du placenta était diminué dans le groupe HF (Tableau 5).

Tableau 5 : Données du sacrifice à E18.5 dans les groupes T et HF

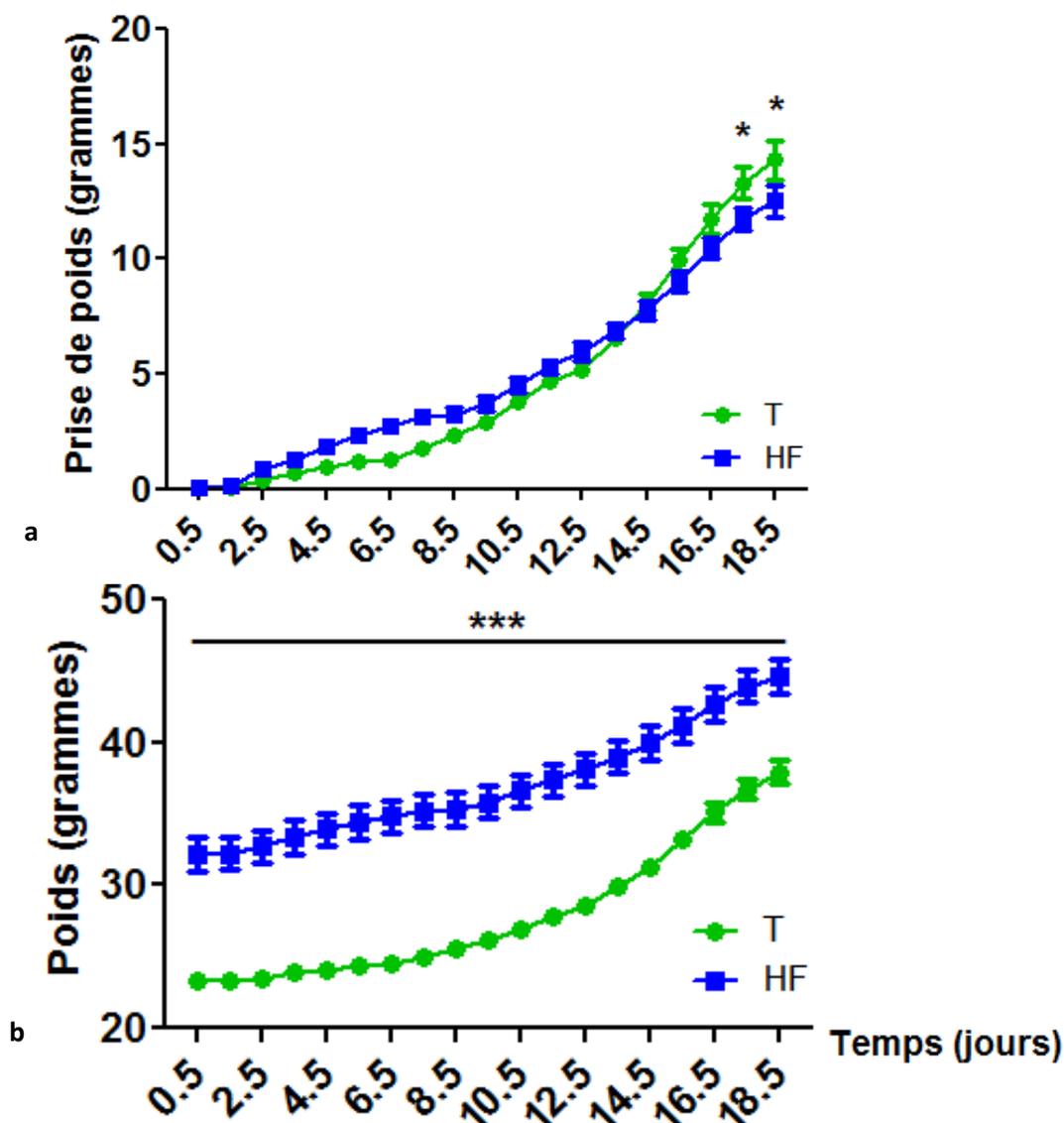
	MERES		
	TEMOINS (n=30)	HF (n=30)	P
Délai nécessaire pour concevoir (j)	2.9 ± 2.6	3.9 ± 4.0	0.40
Gain de poids pendant la gestation (g)	14.7 ± 3.1	12.7 ± 2.8 *	0.04
Glycémie à jeun (g/L)	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.4	0.29
Insulinémie à jeun (µg/L)	0.2 ± 0.2	2.8 ± 2.1	0.06
HOMA-IR	2.2 ± 2.1	26.2 ± 11.9	0.06
	SOURICEAUX		
	TEMOINS (n=30)	HF (n=30)	
Nb de souriceaux par portée	8.0 ± 1.9	5.7 ± 2.9	0.20
Poids des souriceaux (mg)	1074.0 ± 170.8	867.1 ± 260.4	0.002
Poids des placentas (mg)	97.0 ± 13.0	112.7 ± 19.4 **	0.007
Ration poids NN / poids placenta	11.3 ± 0.3	8.3 ± 0.5	< 0.0001

J : jours ; g : grammes ; mg : milligrammes ; L : litres ; HF : High Fat ; NN : Nouveau-Né ; Valeurs en moyenne ± E.S.M. * P < 0.05 ; ** P < 0.01.

Prise de poids au cours de la gestation

La prise de poids chez les mères au cours de la gestation était moins importante dans le groupe HF que dans le groupe T (12.65g ± 2.81g, vs 14.66g ± 3.14 g respectivement, $p=0.04$) (Figure 22 a). De plus, la prise de poids chez les souris HF était relativement constante alors que chez les souris T, on notait une nette accélération de la prise de poids à partir de E7.5. La différence de poids entre les deux groupes reste néanmoins statistiquement significative tout au long de la gestation ($P<0.001$) (Figure 22 b).

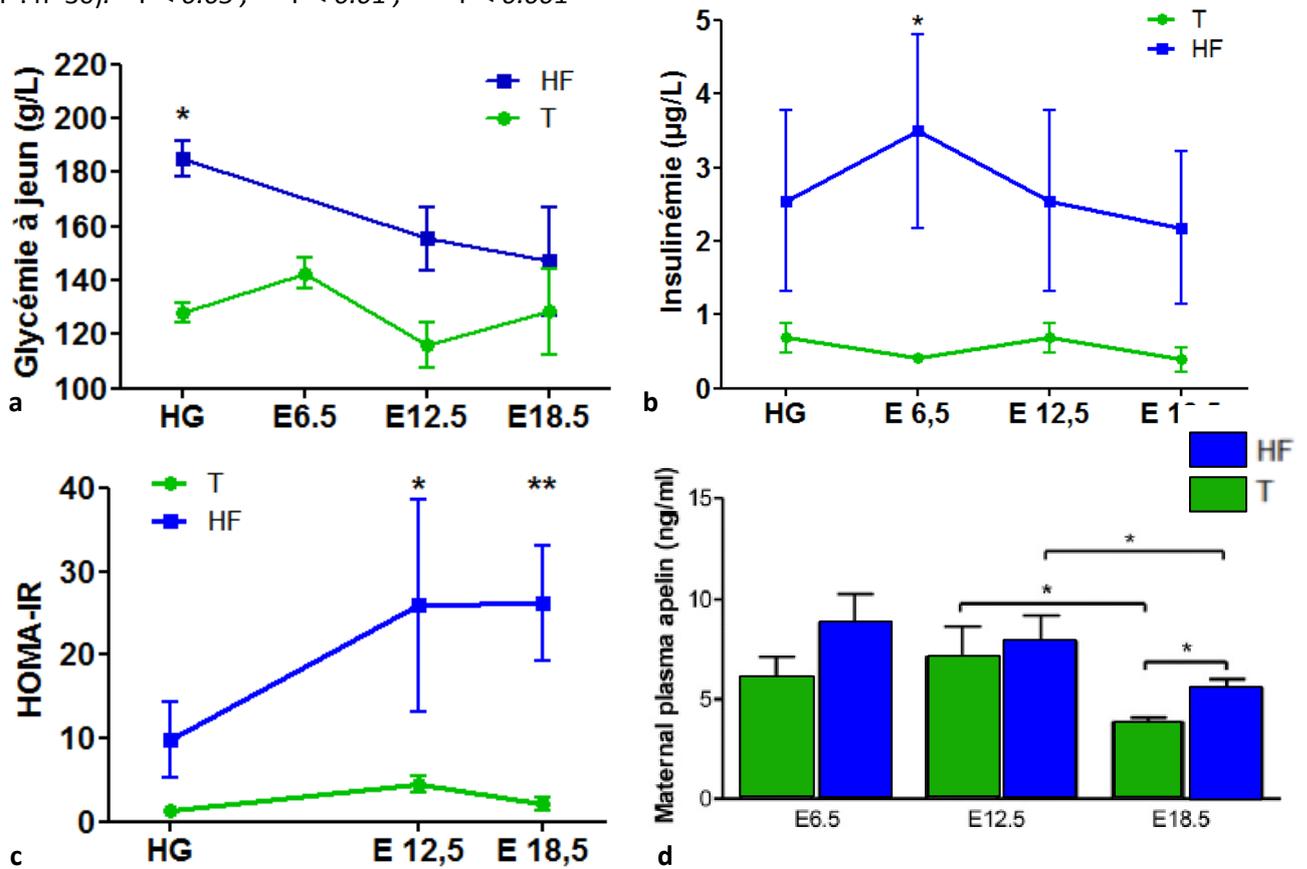
Figures 22 a-b : a : Prise de poids au cours de la gestation chez les souris T et HF. * $P < 0.05$; b : Variation du poids au cours de la gestation chez les souris T et HF (T : $n = 30$; HF : $n = 30$). $P < 0.001$



Apelinémie et marqueurs glucidiques au cours de la gestation

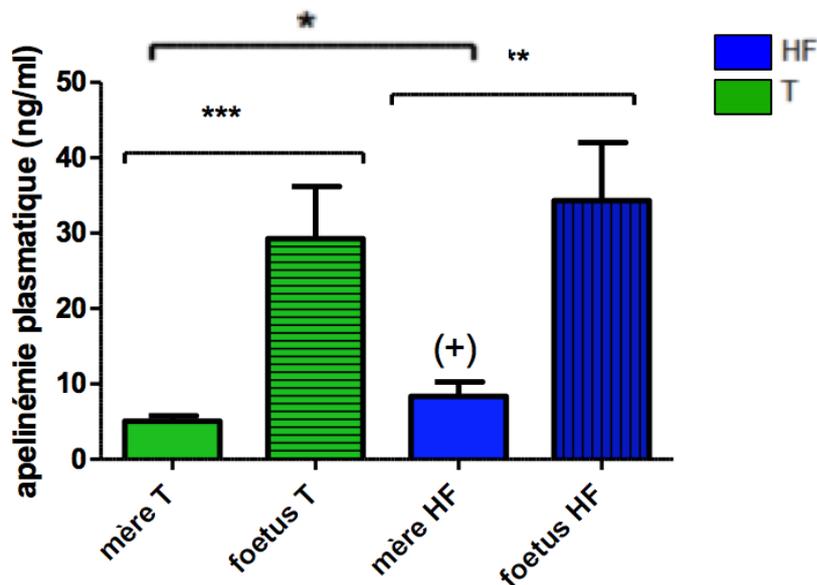
Au cours de la gestation, il n'y avait pas de différence entre les glycémies à jeun des 2 groupes (Figure 23 a). Chez les souris obèses, il y avait une augmentation de l'insulinémie à jeun à E6.5 (Figure 23 b) et de l'HOMA-IR à E12.5 ($P < 0.05$) et à E18.5 ($P < 0.01$) (Figure 23 c). Il y avait une diminution de l'apelinémie dans les 2 groupes en fin de gestation, mais de façon plus importante dans le groupe HF que dans le groupe Témoin ($P = 0.01$) (Figure 23 d).

Figures 23 a-d : a : Glycémie à jeun ; b : insulïnémie à jeun ; c : HOMA-IR ; et d : apelinémie à jeun hors gestation (HG) et au cours de la gestation à E6.5, E12.5 et E18.5 chez les souris T et HF (T : n=30 ; HF : n=30). * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001



Il n'y avait pas de différence entre les taux d'apeline plasmatique chez les souriceaux issus des 2 groupes (Figure 24). Les taux d'apeline plasmatique étaient plus élevés chez les souriceaux que chez leurs mères, mais cette différence n'est statistiquement significative que dans le groupe Témoin ($P < 0.05$ dans le groupe Témoin et $P = 0.10$ dans le groupe HF) (Figure 24).

Figure 35 : Apelinémie à jeun à E18.5 chez les mères et les souriceaux des groupes T et HF. * $P < 0.05$.



☞ **Modulation par l'obésité de l'expression de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ et de la sécrétion placentaire d'apeline**

Au cours de la gestation, la prise de poids physiologique chez la mère s'accompagne d'une hypertrophie progressive des adipocytes (245). Il a également été montré qu'il existait une augmentation de l'ARN messenger de l'apeline dans le tissu adipeux blanc et brun en première partie de gestation chez le rat, qui pourrait être en rapport avec l'accumulation de graisse à cette période de la gestation (246).

L'apeline est exprimée dans le placenta dès la moitié de la gestation (47,83,102,152,153). Certains auteurs ont suggéré que le système apelinergique pourrait être exprimé dès le début de la gestation et qu'il pourrait être impliqué dans le développement placentaire (136,137), probablement en contrôlant l'angiogenèse placentaire au début de la gestation (159). Chez le rat, il a été montré que les taux placentaires de l'ARNm de l'apeline augmentait en milieu de gestation, puis diminuaient à terme (102). L'apeline pourrait, à ce niveau, être impliquée dans le transport trans-placentaire des nutriments, et notamment du glucose. Toutefois, l'expression de l'apeline au niveau placentaire est modifiée en cas de situation pathologique. Ainsi, Yamaleyeva, *et al.* a montré qu'elle était diminuée chez les femmes pré-éclampsiques alors que l'expression d'APJ était augmentée (146). La (Pyr¹)apeline-13 serait la forme moléculaire prédominante de l'apeline dans les villosités chorales (146) et serait sécrétée par celles-ci (102). Le placenta pourrait donc également être une source d'apeline circulante pour la mère et/ou le fœtus.

Un défaut de sécrétion d'apeline par les villosités chorales pourrait expliquer, du moins en partie, la diminution de l'apelinémie associée à l'augmentation de son expression à ce niveau.

Chez le rat, les placentas sont capables de sécréter *ex-vivo* une quantité élevée d'apeline à E17, cette sécrétion coïncidant avec le taux d'apeline maximal dans les plasmas maternels et fœtaux (102). Chez l'humain, il a été montré que les villosités chorales pouvaient sécréter *ex vivo* de l'apeline (146). Les auteurs ont montré que cette sécrétion était diminuée en cas de pré-éclampsie et que l'AT2 permettait d'inhiber la sécrétion d'apeline par les villosités chorales.

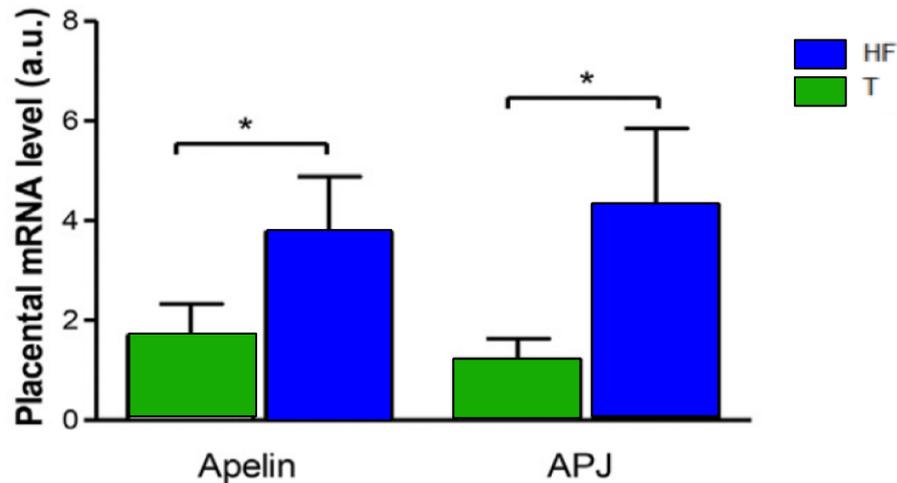
Dans cette partie, nous voulions vérifier si les expressions placentaires d'apeline et d'APJ et la sécrétion placentaire d'apeline étaient modulées par l'obésité chez la souris.

Résultats

Expression placentaire de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ

Il y avait une augmentation de l'expression de l'apeline (x2) et de son récepteur APJ (x3) dans les placentas de souris obèses à E18.5 en comparaison avec le groupe T (Figure 25).

Figure 25: Expression placentaire de l'apeline à E18.5 chez la souris (T : n=12 ; HF : n=12).

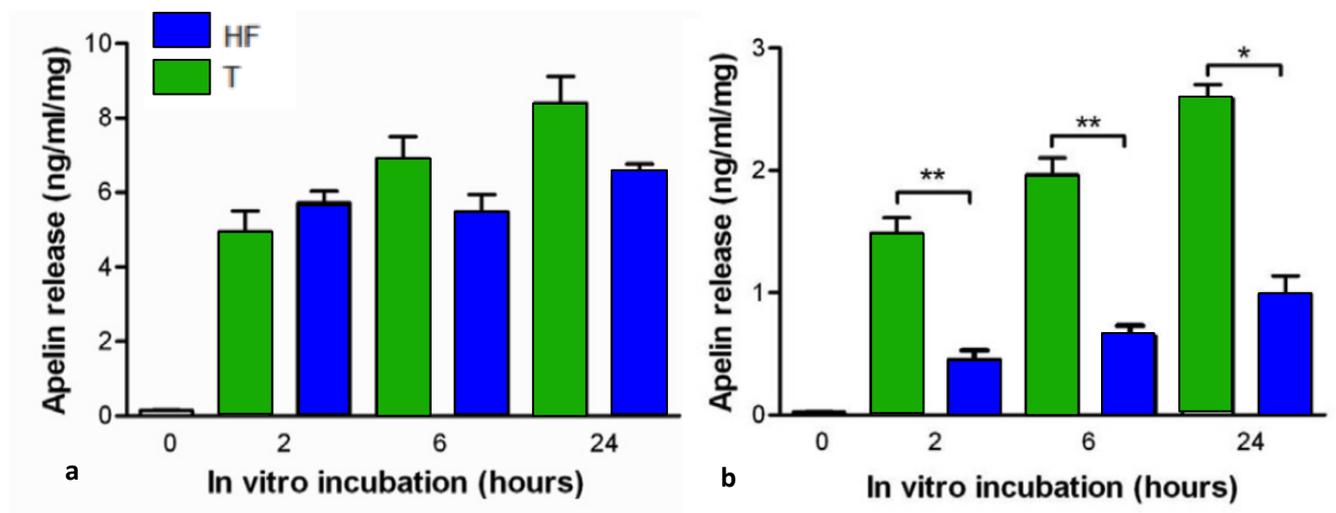


Sécrétion placentaire d'apeline *ex-vivo*

Ex vivo, le placenta sécrétait de l'apeline à E12.5 et E18.5. Cette sécrétion était plus importante en milieu de gestation qu'à terme, et ce dans les 2 groupes.

La sécrétion n'était pas modifiée à E12.5 dans le groupe HF, mais elle diminuait significativement à E18.5 (Figures 26 a-b).

Figures 26 a-b : Sécrétion d'apeline par le placenta. a : à E12.5 ; et b : à E18.5 (T : n=12 ; HF : n=12).



Conclusion de la 1ère partie

En conclusion, nous avons montré que, chez la souris obèse et insulino-résistante, soumise à un régime hypercalorique hyperglucidique et hyperlipidique avant et au cours de la gestation, le système apelinergique était altéré en fin de gestation, aussi bien chez la mère que dans le placenta.

Après 3 mois de régime, les souris HF étaient obèses et intolérantes aux hydrates de carbone. Il n'y avait pas de différence d'apelinémie à jeun entre les souris de poids normal et les souris obèses en dehors de la gestation. Il y avait au cours de la gestation une augmentation de l'apelinémie à E12.5 dans les 2 groupes, plus importante dans le groupe HF, puis une diminution de l'apelinémie à E18.5 dans les 2 groupes, avec une moindre diminution dans le groupe HF.

Les placentas des souriceaux HF avaient un poids supérieur à ceux des portées T. L'expression placentaire de l'apeline et d'APJ était augmentée dans les placentas de souris obèses. Il y avait une sécrétion *ex-vivo* d'apeline dans les placentas murin, moindre chez les sujets obèses.

Il semble que l'apeline puisse être un acteur clé de la régulation de l'adiposité, de l'insulinorésistance et qu'elle joue probablement un rôle important dans le développement de l'unité fœto-placentaire.

Le modèle animal présente l'avantage de pouvoir effectuer des analyses non réalisables chez la femme (analyse des organes internes...), mais présente toutefois des spécificités et on ne peut donc pas transposer directement ces résultats chez l'humain.

Dans la seconde partie de ces travaux, nous allons vérifier si de telles altérations étaient retrouvées chez la femme enceinte obèse, en étudiant plus particulièrement le plasma, la placenta et le colostrum.

2^{ème} PARTIE

FEMME ENCEINTE OBESE

ETUDE OB-APE

L'apeline pourrait être une hormone bénéfique pour l'organisme et semble être cruciale pour le développement de l'unité foeto-placentaire (140).

Les résultats présentés dans la première partie de cette thèse montrent que, chez l'animal, le système apelinergique était altéré au cours de la gestation chez la souris obèse (153). Il y avait dans les 2 groupes (T et HF) une augmentation de l'apelinémie à E12.5, suivie d'une diminution à terme à E18.5. Par ailleurs, il y avait une hyperapelinémie à terme chez les souris HF en comparaison avec les souris T. A notre connaissance, aucune étude ne s'était intéressée aux modulations du système apelinergique en cas d'obésité chez la femme enceinte obèse. Ce système semble pourtant être crucial pour le développement de l'unité foeto-placentaire (140).

Afin de vérifier ces résultats dans l'espèce humaine, nous avons mené une **étude chez la femme obèse, intitulée OB-APE (Obésité – APEline)**, afin de déterminer si le système apelinergique était également modulé par l'obésité au cours de la grossesse chez la femme.

L'objectif était d'étudier les variations des taux d'apeline plasmatique en fonction de la présence d'une obésité, plus ou moins associée à un DG, et d'analyser la sécrétion placentaire d'apeline dans ces situations.

Nous avons pour cela étudié les taux plasmatiques d'apeline chez la mère en fin de grossesse, au moment de l'accouchement et au 2^{ème} jour du post-partum, et son enfant à la naissance, puis au niveau placentaire l'expression de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ, ainsi que la sécrétion placentaire *ex-vivo* de l'apeline, et enfin les concentrations en apeline dans le colostrum.

MATERIELS ET METHODE

ETUDE OB-APE

II. Modèle humain d'obésité – étude OB-APE

II.1. Objectif principal et objectifs secondaires

L'**objectif principal** de cette étude était de comparer les taux d'apeline plasmatique en fin de grossesse chez les femmes obèses et chez les femmes de poids normal, hors diabète gestationnel.

Les **objectifs secondaires** étaient :

- Comparer les taux d'apeline plasmatique en fin de grossesse chez les femmes obèses ayant un diabète gestationnel et chez les femmes obèses n'ayant pas de diabète gestationnel afin de vérifier si les différences observées sont plutôt dues à l'obésité elle-même ou à l'hyper insulinisme associé
- Comparer les taux d'apeline plasmatique chez la mère et chez le nouveau-né
- Corréler l'apelinémie dans le sang de cordon au poids et à la taille de naissance de l'enfant, ainsi qu'au poids du placenta
- Corréler les taux d'apelinémie aux marqueurs d'adiposité et de la régulation glycémique
- Comparer les taux d'apeline dans le colostrum maternel entre les femmes obèses et non obèses et les corréler aux taux d'apeline dans le plasma maternel à 48 heures après l'accouchement
- Etudier l'expression de l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ dans le placenta lors de l'accouchement et la sécrétion ex-vivo de l'apeline par le placenta.

II.2. Conception de la recherche

II.2.1. Type d'étude

L'étude OB-APE (OBésité-APEline) est une étude prospective, transversale, comparative, unicentrique, menée au sein de la maternité Jeanne de Flandre, du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, entre mai 2016 et juillet 2017. Cette étude a reçu l'approbation du comité de protection des personnes (n° 2015 A01696 43) et de l'ANSM (n° 2015-A01696-43), et est inscrite dans clinical trial sous le code protocole n° 2014_70. Un financement de 30.000€ a été obtenu via l'appel à projet Emergence du CHRU de Lille.

II.2.2. Population étudiée

Les patientes étaient incluses au 3^{ème} trimestre de grossesse, au cours d'une consultation prénatale, lorsqu'elles remplissaient les critères d'éligibilité. Une note d'information expliquant les modalités de l'étude et sa finalité était remise à la patiente et son consentement était recueilli par écrit.

L'inclusion se faisait dans 3 groupes en fonction de l'IMC ante-conceptionnel et de la présence ou non d'un diabète gestationnel (DG) :

- groupe « **normal** » (**N**) : patientes avec un IMC compris entre 18,5 et 25 kg/m² ;
- groupe « **obèse** » sans diabète gestationnel (**O**) : patientes avec un IMC \geq 30 kg/m², ne présentant ni DG, ni diabète antérieur à la grossesse ;
- groupe « **obèse avec diabète gestationnel** » (**ODG**) : patientes avec un IMC \geq 30 kg/m², présentant un DG.

Les patientes du groupe N présentant des facteurs de risque de DG (âge > 35 ans, antécédent familial de diabète au 1^{er} degré, antécédent personnel de DG ou de macrosomie) et l'ensemble des patientes obèses ont bénéficié d'un dépistage du diabète gestationnel. Ce dernier consistait en la réalisation d'une glycémie à jeun au 1^{er} trimestre de grossesse, puis en cas de normalité, d'une HPO 75 grammes (Hyperglycémie Provoquée Orale) réalisée entre 24 et 28 SA. En cas de suspicion de macrosomie fœtale (biométries > 95^{ème} percentile) ou d'hydramnios (grande citerne de liquide amniotique > 80 mm) lors de l'échographie du 3^{ème} trimestre, un dépistage plus tardif par cycle glycémique (glycémie à jeun > 0.92 g/L et/ou glycémie post-prandiale > 1.20 g/L) pouvait être réalisé.

Les **critères d'inclusion** étaient les femmes entre 18 et 42 ans, assurées sociales, présentant une grossesse unique dont le terme était compris entre 35 et 40 SA et consentantes après une information éclairée.

Les **critères d'exclusion** étaient : un diabète antérieur à la grossesse, une HTA, une pré-éclampsie, un RCIU < 10^{ème} percentile, un traitement médicamenteux au long cours hors suppléments habituelles de la grossesse, une consommation de tabac (> 5 cigarettes/jour) ou de drogue, une insuffisance rénale, hépatique ou cardiaque, un antécédent de chirurgie bariatrique, une anoxie fœtale avec un pH au cordon ombilical inférieur à 7,0, une anomalie génétique ou chromosomique de la mère et/ou du nouveau-né diagnostiquée en prénatal, une malformation fœtale diagnostiquée en prénatal. En cas de survenue d'un critère d'exclusion après inclusion de la patiente, celle-ci était exclue secondairement. En cas d'apparition secondaire d'un diabète gestationnel chez les femmes du

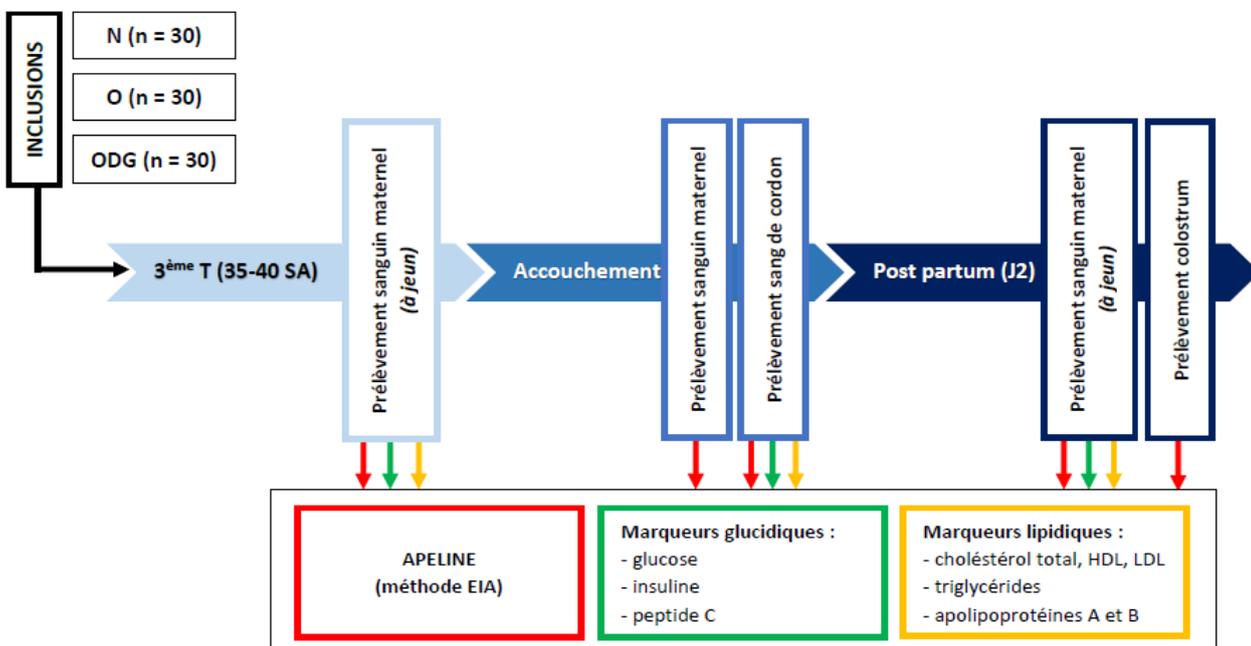
groupe O, celles-ci étaient exclues du groupe O et étaient réincluses dans le groupe ODG. Il était prévu que dans cette situation, une patiente supplémentaire pourrait être incluse dans le groupe O pour chaque patiente ayant été exclue de ce groupe pour ce motif.

Les patientes bénéficiaient d'un suivi de grossesse habituel dans les suites de l'inclusion, comprenant une consultation prénatale mensuelle jusqu'à l'accouchement, une surveillance rapprochée aux urgences en cas de grossesse prolongée après le terme, ainsi qu'une hospitalisation en suite de naissance pour une durée de 2 à 5 jours après l'accouchement. Les patientes présentant un DG bénéficiaient en plus d'un suivi personnalisé en Hôpital de Jour de Diabétologie associant des consultations et des appels téléphoniques, afin de s'assurer du bon équilibre glycémique et instaurer des règles hygiéno-diététiques adaptées à chacune. La prise en charge du DG se faisait conformément aux recommandations du CNGOF (247–249).

II.2.3. Déroulement de l'étude

Le 1er prélèvement était réalisée à jeun (> 12 heures) entre 35 et 40 SA (Figure 27). L'apeline était dosée, ainsi que des marqueurs glucidiques (glycémie, insulinémie, peptide C) et lipidiques (cholestérol total, HDL, LDL, triglycérides, apolipoprotéines A et B). Au moment de l'accouchement, un 2^{ème} prélèvement était réalisé chez la mère et du sang veineux était recueilli au niveau du cordon ombilical après clampage. Des biopsies placentaires étaient prélevées dans le même temps. Enfin, un dernier prélèvement maternel était réalisé à jeun (> 12 heures) au 2^{ème} jour suivant l'accouchement. Au même moment et en cas d'allaitement maternel, du colostrum était recueilli.

Figure 27 : Schéma de l'étude OB-APE (N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; T : trimestre ; SA : semaines d'aménorrhée ; J2 : 2^{ème} jour).



II.3. Critères d'évaluation

Le **critère de jugement principal** était le taux d'apeline plasmatique entre 35 et 40 SA à jeûn chez les femmes obèses sans DG et chez les femmes de poids normal sans DG.

Les **critères de jugement secondaires** étaient:

- L'apelinémie chez la mère et le nouveau-né à la naissance et chez la mère à J2 de l'accouchement
- Les concentrations d'apeline dans le colostrum maternel à 48 heures de l'accouchement
- Poids, IMC, prise de poids pendant la grossesse
- Poids et taille du nouveau-né, poids du placenta
- Marqueurs biologiques d'adiposité (cholestérol, triglycérides, apolipoprotéines)
- Marqueurs du métabolisme glucidique (glycémie, insuline et peptide C)
- L'expression de l'ARNm de l'apeline et d'APJ dans le placenta à la naissance et sécrétion *ex-vivo* d'apeline par le placenta

II.4. Techniques

II.4.1. Collections biologiques

II.4.1.1. Plasma

Les prélèvements sanguins réalisés au 3^{ème} trimestre de grossesse, sur le cordon ombilical et en post-partum étaient composés de 4 tubes de 4 mL :

- 2 tubes étaient envoyés au CBP (Centre de Biologie Pathologie) du CHRU de Lille par le TAL (Transport Automatique Léger) pour analyse des taux plasmatiques de cholestérol (total, HDL et LDL), de triglycérides (TG), des apolipoprotéines A et B, ainsi que de la glycémie ;
- 2 tubes étaient transportés au CIC (Centre d'Investigation Clinique) du CHRU de Lille afin que le plasma, une fois centrifugé, soit réparti dans des aliquots de 200 µL et congelé à -80°C, pour la mesure de l'apelinémie, ainsi que des taux plasmatiques d'insuline, de peptide C et de leptine.

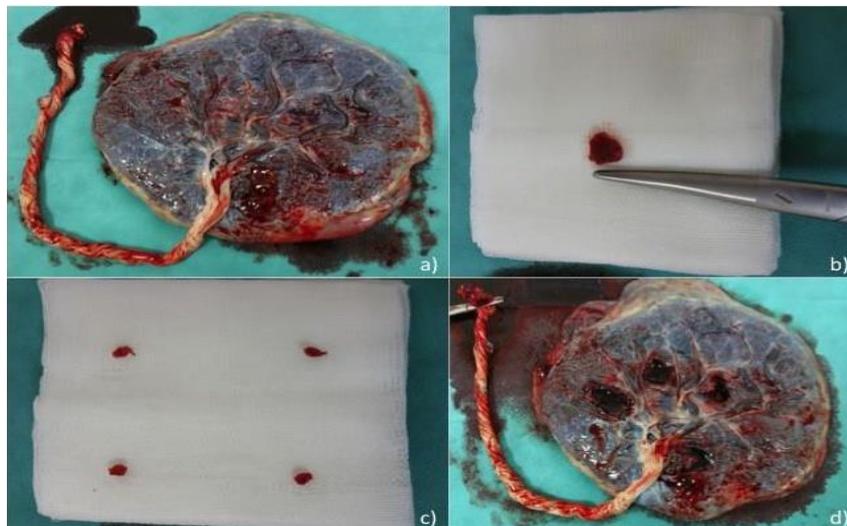
Le prélèvement sanguin maternel réalisé au moment de l'accouchement n'était pas nécessairement réalisé à jeun et ne se composait que d'un tube, destiné à doser l'apeline.

II.4.1.2. Placenta

Après la naissance, les placentas étaient stockés à -4°C en attendant la réalisation des biopsies (24 heures maximum pour les RT-qPCR et 1 heure maximum pour les sécrétions) (délai validé au sein de notre laboratoire dans le cadre de l'étude DIAMAND).

Les placentas humains étaient pesés, puis 4 zones étaient prélevées (environ 20-25 mg de tissu) à mi-chemin entre la face maternelle et la face fœtale, en abordant le placenta par la face fœtale afin d'éliminer le maximum de vaisseaux sanguins, dans une zone proche du cordon, après avoir ôté les membranes. Les biopsies étaient rincées dans du SSI à 9‰, puis étaient disséquées pour éliminer les membranes, les vaisseaux sanguins et les dépôts calciques (Figure 28). Chaque biopsie placentaire était ensuite divisée en 2 et l'un des morceaux était utilisé pour la réalisation des sécrétions et l'autre pour la RT-qPCR.

Figure 28 : Prélèvements placentaires chez l'humain. a : Face fœtale du placenta avant les prélèvements, b : Biopsie placentaire avant dissection (20-25mg), c : 4 biopsies de villosités choriales, d : Placenta après prélèvements.



II.4.1.3. Colostrum humain

Le colostrum (5 mL minimum) était recueilli au 2^{ème} jour du post-partum dans un pot stérile, puis conservé au CIC à -80°C .

II.4.2. Dosages biologiques

II.4.2.1. Marqueurs glucidiques et lipidiques

Chez la femme, les dosages lipidiques étaient réalisés au CBP selon des techniques standardisées : le cholestérol, l'HDL, le LDL et les triglycérides étaient dosés par électrophorèse après ultracentrifugation analytique ; les apolipoprotéines étaient dosés à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-apolipoprotéine.

L'insuline et peptide C étaient dosés au CBP par technique immunoenzymatique.

II.4.2.1. Dosage de l'apeline

Les dosages de l'apeline dans les plasmas maternel et néonatal ont été réalisés par technique immunoenzymatique (EKE-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA). Les dosages dans le colostrum ont été réalisés à l'aide du même kit, après vérification de l'absence d'effet d'inhibition.

Les concentrations ont été calculées à partir des absorbances, lues à 450nm, obtenues par spectrophotométrie (Bio-Rad), à l'aide de courbes standards avec le logiciel «Myassays.com».

II.4.3. Sécrétions placentaires d'apeline

Chaque prélèvement placentaire destiné aux sécrétions était rincé dans du sérum salé isotonique à 9‰ puis mis dans des boîtes de pétri contenant 2ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) (146). Dans la 1^{ère} boîte, aucun additif n'était ajouté. Dans la 2^{ème} boîte était ajouté 50nM d'insuline (48) et dans la 3^{ème}, 1nM d'AT2 (241). Ces plaques étaient placées à 37°C avec 95% d'O₂, 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Un échantillon de 200µL du milieu était prélevé après 2, 6 et 12 heures d'incubation, puis un dosage était réalisé par ELISA (référence EK-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA), après vérification de l'absence d'effet d'inhibition.

II.4.4. Expression placentaire de l'ARNm de l'apeline et d'APJ

Chaque prélèvement placentaire destiné à l'étude de l'expression était rincé dans du sérum salé isotonique à 9‰ puis mis dans du RNA later pendant 24 heures à 4°C puis était conservé à -80°C.

Les méthodes d'analyse par RT-qPCR ont été précédemment décrites (242). Les RT-qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur (LightCycler 480, Roche, France). Nous avons utilisé des amorces pré-validées pour les gènes de l'apeline et d'APJ (GT00047775 et QT00221592, QuantiTect Primer Assays, Qiagen). Les RT-qPCR étaient réalisées en utilisant une solution de master mix SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, France), une solution d'amorces sens et antisens pour la Cyclophiline A et RPS 28 ou une solution 10X contenant les amorces sens et antisens pour l'Apeline et de l'ADNc dilué au 1/10^{ème}. Les amorces pour apeline, APJ, les gènes d'intérêt et les gènes de ménage (Cyclophiline A et RPS 28) sont reportées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR, chez la souris (46) et chez l'humain.

Espèces	Gènes	Séquences	
		Sens	Anti-sens
Humain	Apeline	CCCATGCCTTTCTGAAGCAG	CCTCCAGAGAAGCAGACCAA
	APJ	AGCAGGGCTGATGAATGGATGT	GCCAAGCAGTGTCTGGACTAAAT
	Cyclophiline A	GCATACGGGTCTGGCATCTTGCC	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
	RPS 28	CGA TCC ATC ATC CGC AAT G	AGC CAA GCT CAG CGC AAC

II.5. Analyse statistique

II.5.1. Calcul du nombre de sujets nécessaires

L'objectif principal est de comparer les taux d'apeline plasmatique en fin de grossesse chez les femmes obèses et chez les femmes de poids normal, hors diabète gestationnel. L'analyse de l'objectif principal sera réalisée par une comparaison de la moyenne de l'apelinémie entre les groupes des femmes obèses non diabétiques et témoins non obèses non diabétiques. Il s'agit d'une étude pilote : il n'existe pas de données permettant de calculer un nombre de sujets sur la base d'hypothèse statistique. L'estimation du nombre de sujets est basée sur la taille de l'effet attendue. La taille de l'effet est égale à la différence des moyennes observées entre les groupes, divisée par la déviation standard estimée. Elle permet donc de normaliser la différence observée par rapport à la déviation standard. D'après Cohen, et al. (250), la taille de l'effet s'interprète de la manière suivante : 0,2 correspond à une taille de l'effet faible, 0,5 à une taille de l'effet moyenne et 0,8 à une taille de l'effet importante. Nous attendons une taille de l'effet supérieure à un effet moyen, et nous fixons cette taille de l'effet à 0,6. En considérant une puissance de 80%, un risque de première espèce de 5% et une taille de l'effet de 0,6, il faut recruter 45 sujets par groupe. Nous proposons donc de recruter 45 femmes obèses non diabétiques, 45 témoins. Pour répondre à l'objectif secondaire, nous comparerons la moyenne de l'apelinémie entre les groupes des femmes obèses diabétiques et des femmes obèses non diabétiques. Nous proposons, pour obtenir des groupes équilibrés, de recruter également 45 patientes obèses diabétiques.

Les participantes exclues en cours d'étude ont été remplacées par une inclusion supplémentaire.

Le seuil de significativité retenu est $P < 0.05$.

II.5.2. Méthode et stratégie d'analyse

Les analyses statistiques définitives (après inclusion de l'intégralité des patientes) seront réalisées à l'aide du logiciel SAS (version 9.3 ou supérieure) et conduite à la plate forme d'aide méthodologique du CHRU de Lille sous la responsabilité du Pr A. Duhamel. Les résultats intermédiaires présentés dans cette thèse ont été effectués à l'aide du logiciel Prism 7[®] (GraphPad Software, INC., La Jolla, CA, USA) sous la responsabilité du Dr S. Hanssens.

Tous les tests statistiques seront bilatéraux avec un risque de première espèce de 5%. Les variables

qualitatives seront décrites par les effectifs et les pourcentages (n (%)). Les variables quantitatives seront décrites par la moyenne et l'écart standard à la moyenne (ESM) en cas de distribution gaussienne, ou par la médiane et l'interquartile (i.e. 25^{ème} et 75^{ème} percentiles) dans le cas contraire. La normalité des distributions sera testée par un test de Shapiro-Wilk et vérifiée graphiquement par des histogrammes.

II.5.2.1. Analyse de l'objectif principal

L'objectif principal est de comparer les taux d'apeline plasmatique en fin de grossesse chez les femmes obèses et chez les femmes de poids normal, hors diabète gestationnel. L'analyse de l'objectif principal sera réalisée par un test de Student en cas de normalité du paramètre ou un test de Mann-Whitney dans le cas contraire.

II.5.2.2. Analyse des objectifs secondaires

1) Vérifier si le diabète gestationnel n'est pas un facteur confondant en cas d'obésité

Les taux d'apeline plasmatique en fin de grossesse chez les femmes obèses non diabétiques et chez les femmes obèse diabétiques seront comparés par un test de Student en cas de normalité du paramètre ou un test de Mann-Whitney dans le cas contraire.

2) Comparer les taux d'apeline plasmatique chez la mère et chez le nouveau-né

Cette comparaison sera effectuée séparément dans le groupe des femmes obèses et dans le groupe des femmes de poids normal. L'analyse sera réalisée par un test de Student apparié en cas de normalité du paramètre ou un test de Wilcoxon dans le cas contraire. En cas d'existence de paires incomplètes (une mesure exploitable chez la mère et inexploitable chez son nouveau-né ou vice versa), nous emploierons le modèle linéaire mixte.

3) Corréler l'apelinémie dans le sang de cordon au poids et à la taille de naissance de l'enfant ainsi qu'au poids du placenta

Nous utiliserons le test du coefficient de corrélation de Pearson en cas de loi normale et le test du coefficient de corrélation de Spearman dans le cas contraire.

4) Corréler les taux d'apelinémie aux marqueurs d'adiposité et de la régulation glycémique

Nous utiliserons le test du coefficient de corrélation de Pearson en cas de loi normale et le test du coefficient de corrélation de Spearman dans le cas contraire.

5) Comparer les taux d'apeline dans le colostrum maternel entre les femmes obèses et non obèses

L'analyse sera réalisée par un test de Student en cas de normalité du paramètre ou un test de Mann-Whitney dans le cas contraire.

6) Corréler les taux d'apeline dans le colostrum maternel à ceux dans le plasma maternel

Nous utiliserons le test du coefficient de corrélation de Pearson en cas de loi normale et le test du coefficient de corrélation de Spearman dans le cas contraire.

RESULTATS

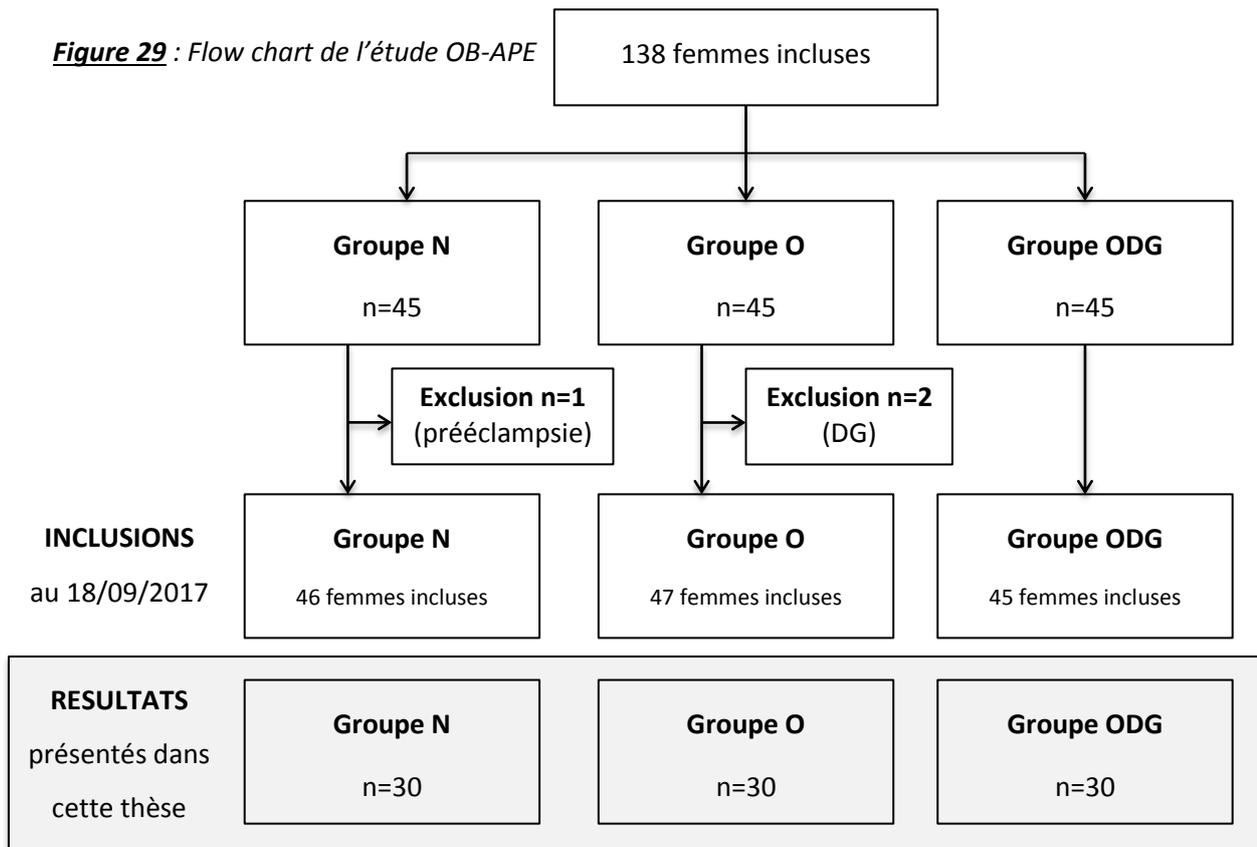
ETUDE OB-APE

☞ Concentrations plasmatiques d'apeline chez la femme enceinte obèse au cours de la grossesse, lors de la naissance et en post-partum immédiat et chez le nouveau-né à l'accouchement

L'étude OB-APE a inclu 138 patientes entre le 19/05/16 et le 18/09/17. Dans le groupe O, il y a eu 2 patientes exclues pour avoir développé un diabète gestationnel après le test de dépistage réalisé entre 24 et 28 SA. Dans ces 2 cas, le diagnostic avait été réalisé après l'inclusion dans le groupe O et les patientes ont été réincluses dans le groupe ODG. Dans le groupe N, une patiente a été exclue pour survenue d'une prééclampsie. Ces 3 patientes exclues ont été remplacées par de nouvelles inclusions dans les groupes respectifs, comme cela était prévu dans le protocole de l'étude.

Compte-tenu des difficultés de recueil dans le groupe O, du mode de stockage des échantillons au CBP et du court délai entre l'inclusion de la dernière patiente et l'impression de cette thèse, il n'a pas été possible de présenter ici les résultats de l'ensemble de l'étude. Les résultats présentés ci-dessous sont donc des résultats intermédiaires sur les 30 premières patientes de chaque groupe (Figure 29).

Figure 29 : Flow chart de l'étude OB-APE



N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; DG : diabète gestationnel.

Caractéristique des patientes

Conformément au design de l'étude, il y avait une différence significative entre l'IMC des patientes des groupes O et ODG et celui des patientes du groupe N. Les femmes du groupe ODG avaient une prise de poids significativement inférieure par rapport aux patientes ayant un IMC normal ($p = 0,006$) (Tableau 7). Les patientes du groupe ODG avaient une glycémie à jeun significativement augmentée par rapport à celles du groupe N. Cinq patientes du groupe ODG (16,7%) avaient bénéficié d'une insulinothérapie après leur inclusion. Celle-ci était poursuivie tout au long de la grossesse et était arrêtée immédiatement après l'accouchement.

Le taux de césarienne était significativement augmenté dans le groupe ODG, en comparaison avec les 2 autres groupes. Dans ce groupe, les césariennes étaient majoritairement programmées ($n=8/12$, 66.7%), notamment pour suspicion de macrosomie fœtale ($N=4/8$, 50%).

Tableau 7 : Caractéristiques maternelles chez la femme

	N	O	ODG	p
	<i>n = 30</i>	<i>n = 30</i>	<i>n = 30</i>	
Age (ans)	30,84 ± 5,44	30,54 ± 5,16	30,82 ± 5,43	0,96
IMC (kg/m ²) avant grossesse	21,36 ± 1,96	34,75 ± 4,75	35,32 ± 5,72	< 0,0001
IMC (kg/m ²) à l'accouchement	25,60 ± 2,30	37,53 ± 3,76	38,20 ± 5,98	< 0,0001
Prise de poids (kg)	11,80 ± 3,60	7,87 ± 9,24	7,87 ± 7,38	0,05
	[+5 – +20]	[-11 – +28]	[-1 – +32]	
Pourcentage de prise de poids (%)	20,08 ± 7,11	8,84 ± 9,99	8,43 ± 7,99	< 0,0001
Glycémie à jeun (g/L) au T3	0,74 ± 0,01	0,77 ± 0,12	0,84 ± 0,13	< 0,0001
Terme d'accouchement (SA)	40,20 ± 1,09	39,86 ± 1,23	39,75 ± 0,94	0,32
Voie d'accouchement				
Voie basse	26 (87,0%)	25 (83,0%)	18 (60,0%)	0,20
Césarienne	4 (13,0%)	4 (13,0%)	12 (40,0%)	0,02
Programmée	2 (50,0%)	2 (50,0%)	8 (66,7%)	-
En urgence	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4 (33,3%)	-
Traitement médical post-partum	0	0	0	-

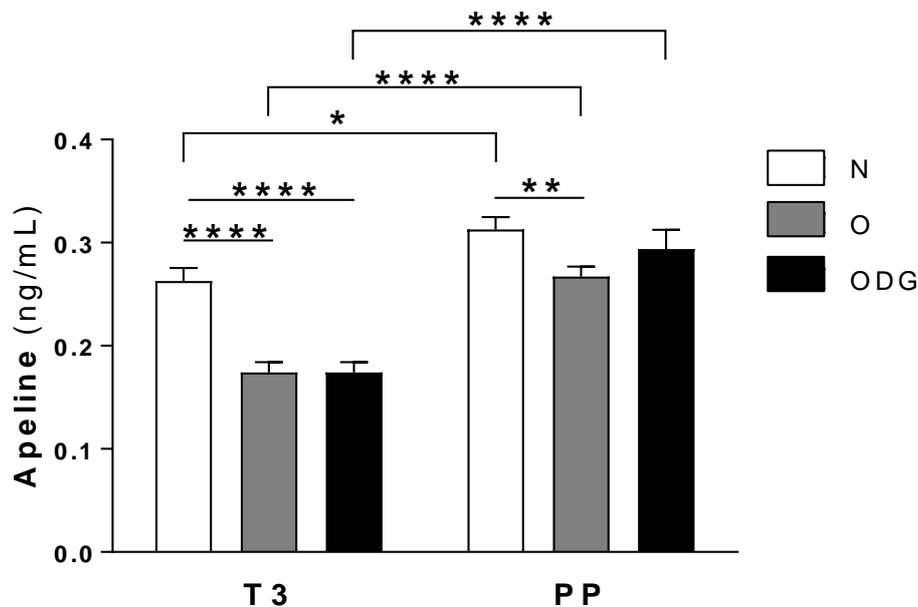
IMC : Indice de Masse Corporelle ; N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; T3 : 3^{ème} trimestre ; SA : semaines d'aménorrhée.

Apelinémie maternelle au 3^{ème} trimestre de la grossesse et au 2^{ème} jour du post-partum

Au 3^{ème} trimestre de la grossesse, il y avait une diminution significative de l'apelinémie dans les groupes O et ODG, en comparaison avec le groupe N ($p < 0,0001$ dans les 2 cas) (Figure 30). Au 2^{ème} jour du post-partum, l'apelinémie restait diminuée de façon significative dans le groupe O par rapport au groupe N ($p = 0,01$). Dans les 3 groupes, l'apelinémie plasmatique augmentait de façon significative entre le 3^{ème} trimestre de grossesse et le post-partum.

Au cours de la grossesse et en post-partum, il n'y avait pas de différence d'apelinémie entre les patientes obèses avec et sans diabète gestationnel.

Figure 30 : Apelinémie maternelle au 3^{ème} trimestre et au 2^{ème} jour du post-partum (n=30/groupe).

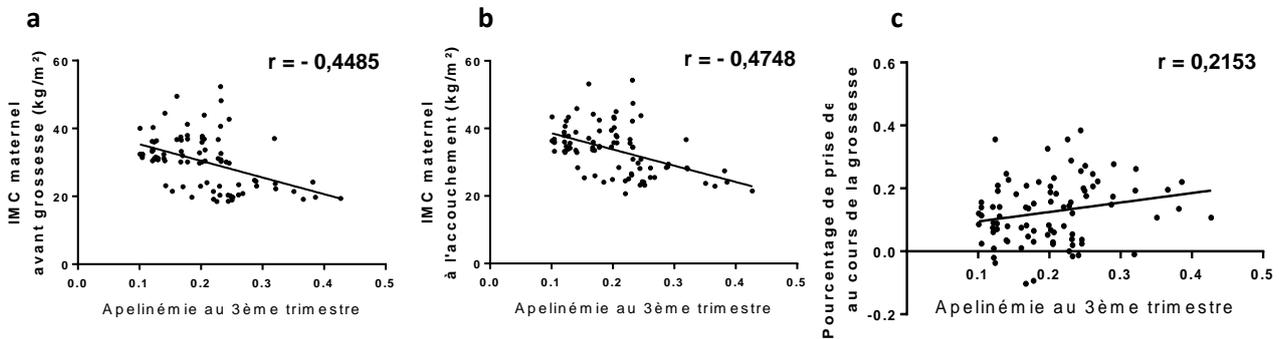


N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; T3 : 3^{ème} trimestre ; PP : post-partum. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

En fin de grossesse, il y avait une corrélation négative entre l'apelinémie maternelle et l'IMC pré-conceptionnel ($p < 0,0001$) (Figure 31 a), ainsi qu'avec l'IMC à l'accouchement ($p < 0,0001$) (Figure 31b) et une corrélation positive entre l'apelinémie et le pourcentage de prise de poids au cours de la grossesse ($p = 0,05$) (Figure 31 c).

Figures 31 a-c : Corrélations entre l'apelinémie maternelle et les caractéristiques pondérales

maternelles. a : avec l'IMC maternel antéconceptionnel ; b : avec l'IMC maternel à l'accouchement ; c : avec le pourcentage de prise de poids.



Corrélation entre l'apelinémie et les marqueurs glucidiques chez la femme enceinte et dans le post-partum

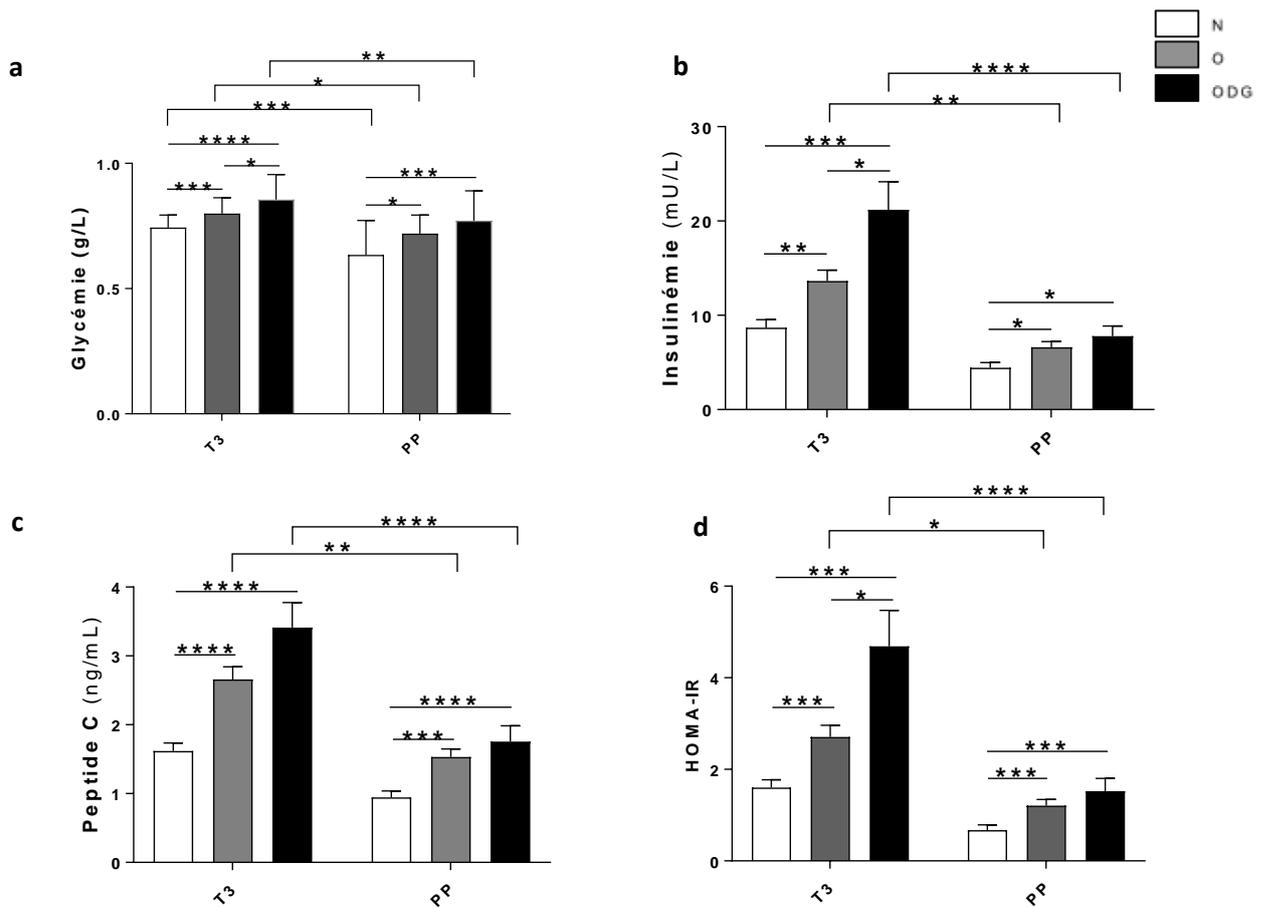
Au 3^{ème} trimestre de grossesse, la glycémie à jeun, l'insulinémie, le peptide C et l'HOMA-IR étaient augmentés dans le groupe ODG par rapport aux groupes N et O ($p < 0,0001$ et $p = 0,02$ respectivement), ainsi qu'entre le groupe O en comparaison avec le groupe N ($p=0.0005$) (Figures 32a-d). En post-partum, ces mêmes éléments restaient significativement augmentés dans le groupe ODG par rapport au groupe N ($p = 0,0005$) et dans le groupe O par rapport au groupe N ($p = 0,02$) (Figures 32a-d). La glycémie était diminuée dans les 3 groupes en post-partum en comparaison avec le 3^{ème} trimestre de la grossesse. L'insulinémie, le peptide C et l'HOMA-IR étaient diminués dans les groupes O et ODG en post-partum en comparaison avec le 3^{ème} trimestre de la grossesse.

Dans le groupe ODG, il ne semblait pas y avoir de différence entre les patientes ayant eu une insulinothérapie au cours de la grossesse ($n = 5$) et celles n'y ayant pas eu recours.

Au 3^{ème} trimestre, l'apelinémie était négativement corrélée à la glycémie à jeun, au peptide C et à l'HOMA-IR au 3^{ème} trimestre de grossesse ($p = 0,002$, $p = 0,02$ et $p=0.05$ respectivement) (Figures 33a-b) et à la glycémie à jeun et au peptide C en post-partum ($p = 0,02$ et $p = 0,02$ respectivement).

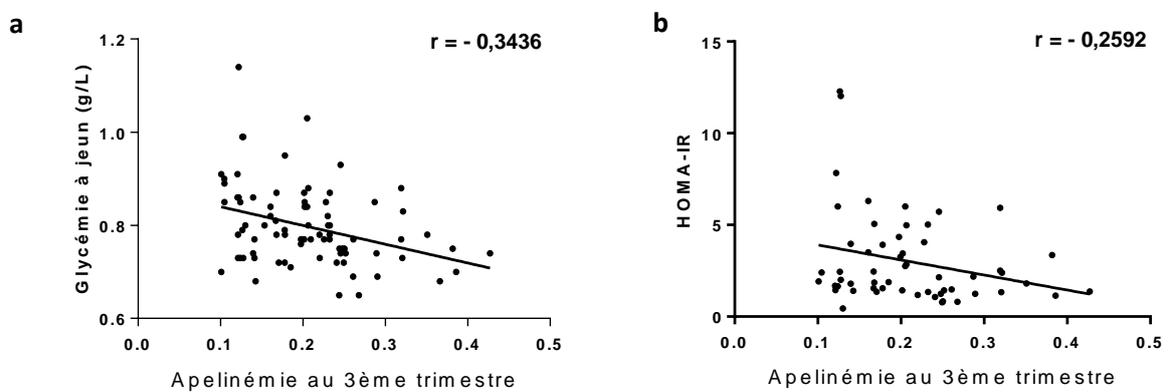
Figures 32 a-d : Modifications du bilan glycémique plasmatique maternel au cours de la grossesse.

a : glycémie ; b : insulínémie ; c : peptide C ; d : HOMA-IR (N : n=30 ; O : n=28 ; ODG : n=28).



N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; T3 : 3^{ème} trimestre ; PP : post-partum. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Figures 33 a-b : Corrélations entre l'apelinémie maternelle et les marqueurs glycémiques plasmatiques au 3^{ème} trimestre de la grossesse. a : avec la glycémie à jeun ; b : avec l'HOMA-IR.



Corrélation entre l'apelinémie et les marqueurs lipidiques chez la femme enceinte et dans le post-partum

Au 3^{ème} trimestre de la grossesse, les taux de cholestérol total, de HDL et de LDL étaient significativement plus bas dans les groupes ODG ($p = 0,003$, $p = 0,004$ et $p = 0,003$ respectivement) et O ($p=0,05$, $p = 0,0008$ et $p = 0,04$ respectivement) en comparaison avec le groupe N (Tableau 8). En post-partum, les taux de cholestérol total et de LDL étaient plus bas dans le groupe ODG par rapport au groupe N ($p = 0,03$ dans les 2 cas). Dans le groupe N, il y avait une diminution du cholestérol total ($p<0.0001$), des LDL ($p = 0,003$) et des apolipoprotéines A ($p = 0,002$) et B ($p = 0,008$) entre le 3^{ème} trimestre et le post-partum (Tableau 8). Dans les groupes O et ODG, la seule différence significative entre ces 2 périodes concernait le cholestérol total ($p<0.0001$ dans les 2 cas).

Il y avait, au 3^{ème} trimestre et en post-partum, une corrélation positive entre l'apelinémie et le taux de cholestérol total ($r = 0,2415$; $p = 0,03$ et $r = 0,35$; $p = 0,005$ respectivement) et d'HDL-cholestérol ($r = 0,2982$; $p = 0,006$ et $r = 0,271$ et $p = 0,03$ respectivement).

Tableau 8 : Bilan lipidique maternel.

	3 ^{ème} trimestre de la grossesse				2 ^{ème} jour du post-partum			
	N	O	ODG	p	N	O	ODG	p
	n = 30	n = 28	n = 28		n = 27	n = 19	n = 27	
Chol total(g/L)	2,95 ± 0,62	2,59 ± 0,79	2,45 ± 0,60	0,02*	2,41 ± 0,49	2,30 ± 0,6	2,13 ± 0,47	0,08
HDL (g/L)	0,73 ± 0,17	0,57 ± 0,15	0,61 ± 0,15	0,0008***	0,65 ± 0,17	0,56 ± 0,15	0,59 ± 0,13	0,10
LDL (g/L)	1,80 ± 0,55	1,45 ± 0,63	1,36 ± 0,51	0,01**	1,36 ± 0,41	1,35 ± 0,51	1,13 ± 0,36	0,10
LDL/HDL	2,18 ± 0,73	2,52 ± 1,07	1,98 ± 0,69	0,57	2,60 ± 1,13	2,59 ± 1,17	2,32 ± 1,00	0,11
TG (g/L)	2,15 ± 0,71	2,34 ± 0,97	2,71 ± 1,53	0,316	2,01 ± 0,41	2,21 ± 0,69	2,09 ± 0,84	0,46
Apo-A1 (g/L)	2,29 ± 0,39	2,00 ± 0,50	2,12 ± 0,34	0,09	1,96 ± 0,40	1,83 ± 0,38	1,88 ± 0,30	0,50
Apo-B (g/L)	1,56 ± 0,40	1,34 ± 0,48	1,34 ± 0,44	0,13	1,25 ± 0,29	1,26 ± 0,36	1,13 ± 0,31	0,27

N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; chol total : cholestérol total ; HDL : High Density Lipoprotein ; LDL : Low Density Lipoprotein ; TG : triglycérides ; ApoA : apolipoprotéine A ; ApoB : apolipoprotéine B.

Relation entre l'apelinémie maternelle et du nouveau-né à l'accouchement**Caractéristiques néonatales**

Dans notre étude, il n'y avait pas de différence significative concernant les caractéristiques cliniques des nouveau-nés (Tableau 9). La seule différence observée concernait les poids placentaires. Les placentas des patientes O et ODG était plus lourds que ceux du groupe N ($p = 0,02$ et $p = 0,002$ respectivement).

Tableau 9 : Caractéristiques du nouveau-né

	N	O	ODG	p
	<i>n = 30</i>	<i>n = 30</i>	<i>n = 30</i>	
Sexe ratio M/F	16/15 (53,0%)	19/11 (63,0%)	21/9 (70,0%)	0,41
Poids NN (g)	3401,00 ± 350,39	3563,17 ± 519,56	3600,20 ± 502,08	0,33
Apgar à 5 min	9,80 ± 0,81	10,00 ± 0	10,00 ± 0	0,14
pH cordon artériel	7,17 ± 0,08	7,20 ± 0,05	7,21 ± 0,06	0,23
pH cordon veineux	7,31 ± 0,06	7,33 ± 0,06	7,33 ± 0,05	0,36
Poids du placenta (g)	488,00 ± 177,47	592,33 ± 300,54	602,44 ± 216,62	0,003
Ratio poids NN / poids placenta	6,97 ± 1,97	6,02 ± 1,73	5,98 ± 0,01*	0,04

N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; M : masculin ; F : féminin ; NN : nouveau-né ; g : grammes.

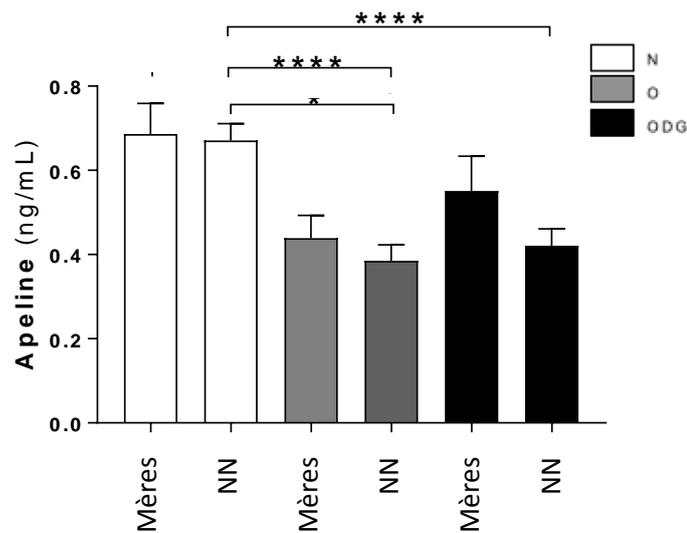
Apelinémie néonatale

A l'accouchement, il y avait une diminution significative des taux d'apeline dans le plasma du cordon des nouveau-nés de mères O et ODG par rapport au groupe N ($p < 0,0001$ dans les 2 cas) (Figure 34). Les concentrations plasmatiques d'apeline néonatales et maternelles étaient comparables au moment de l'accouchement, quel que soit le groupe.

Il y avait une corrélation positive entre l'apelinémie néonatale et l'apelinémie maternelle à l'accouchement ($r = 0,3432, p = 0,004$).

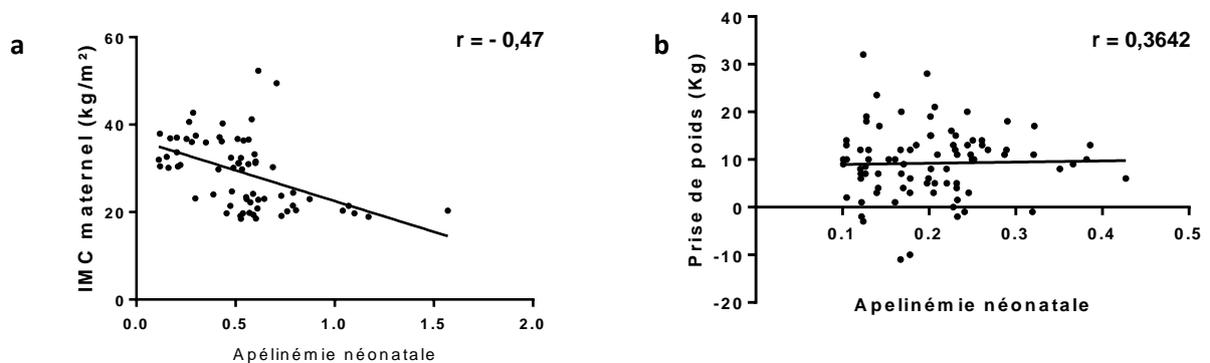
Par ailleurs, il y avait une corrélation négative entre l'apelinémie néonatale et l'IMC maternel préconceptionnel et positive avec la prise de poids maternelle ($p < 0,0001$ et $p = 0,002$ respectivement) (Figures 35 a-b).

Figure 34 : Apelinémie maternelle et néonatale à l'accouchement (N: n=30 ; O: n=28 ; ODG: n=28).



N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Figures 35 a-b : Corrélations entre l'apelinémie néonatale et les caractéristiques pondérales maternelles. A : IMC maternel préconceptionnel ; b : prise de poids maternelle



Dans notre étude, il n'y avait pas de corrélation entre l'apelinémie néonatale et le poids de naissance des nouveau-nés. Il y avait toutefois une tendance entre l'apelinémie néonatale et le poids placentaire ($r = -0,2651$; $p = 0,08$).

Marqueurs glucidiques et lipidiques néonataux

Il y avait une augmentation de l'insulinémie dans les groupes O et ODG en comparaison avec le groupe N ($p < 0,05$ dans les 2 cas) et une augmentation du peptide C dans le groupe ODG en comparaison avec le groupe N ($p < 0,05$) (Tableau 10).

Il n'y avait pas de différence des taux de glycémie à jeun et de peptide C ou de l'HOMA-IR entre les groupes à l'accouchement.

Tableau 10: Marqueurs glycémiques et lipidiques plasmatiques veineux néonataux (au cordon ombilical)

	N	O	ODG	p
	n=28	n=17	n=26	
Glycémie (g/L)	0,63 ± 0,21	0,72 ± 0,22	0,68 ± 0,18	0,39
Insulinémie (mU/L)	4,43 ± 1,59	6,32 ± 4,02	7,73 ± 4,35	0,02
Peptide C (ng/mL)	0,70 ± 0,36	0,94 ± 0,67	1,05 ± 0,49	0,13
Chol total(g/L)	0,63 ± 0,11	0,59 ± 0,13	0,60 ± 0,12	0,49
HDL (g/L)	0,26 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,24 ± 0,06	0,41
LDL (g/L)	0,28 ± 0,07	0,27 ± 0,10	0,27 ± 0,09	0,77
TG (g/L)	0,42 ± 0,22	0,40 ± 0,21	0,42 ± 0,29	0,86
Apo-A1 (g/L)	0,92 ± 0,13	0,87 ± 0,21	0,87 ± 0,09	0,20
Apo-B (g/L)	0,25 ± 0,07	0,25 ± 0,08	0,25 ± 0,08	0,96

N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; chol total : cholestérol total ; HDL : High Density Lipoprotein ; LDL : Low Density Lipoprotein ; TG : triglycérides ; ApoA : apolipoprotéine A ; ApoB : apolipoprotéine B.

Modulations du système apelinergique au niveau placentaire lors de l'accouchement chez la femme enceinte obèse

Expression de l'ARNm de l'apeline et d'APJ

Nous avons étudié 20 échantillons par groupe. Les échantillons avaient une pureté satisfaisante ($A_{260}/A_{280}=2,0$ en moyenne). Afin de tester l'efficacité de nos 4 amorces, nous avons testé 2 gènes cibles (Apeline et APJ) et 2 gènes ménage (RPS28 et cyclo A). L'amorce apeline utilisée ne fonctionnait pas correctement et avait une amplification trop tardive (Figures 36 et 37). D'autres amorces sont en cours de commande. Ces analyses seront réalisées prochainement.

L'expression placentaire d'ARNm d'APJ dans le groupe O était deux fois plus élevée que chez patientes du groupe N (Figure 38). L'expression d'APJ dans les placentas du groupe ODG semblaient être augmentés par rapport au groupe N, mais cette différence n'était pas significative ($p=0.12$).

Figure 36 : Courbe d'amplification de l'amorce apeline: amplification d'un pool d'ADNc de 3 groupes ($n=6$)

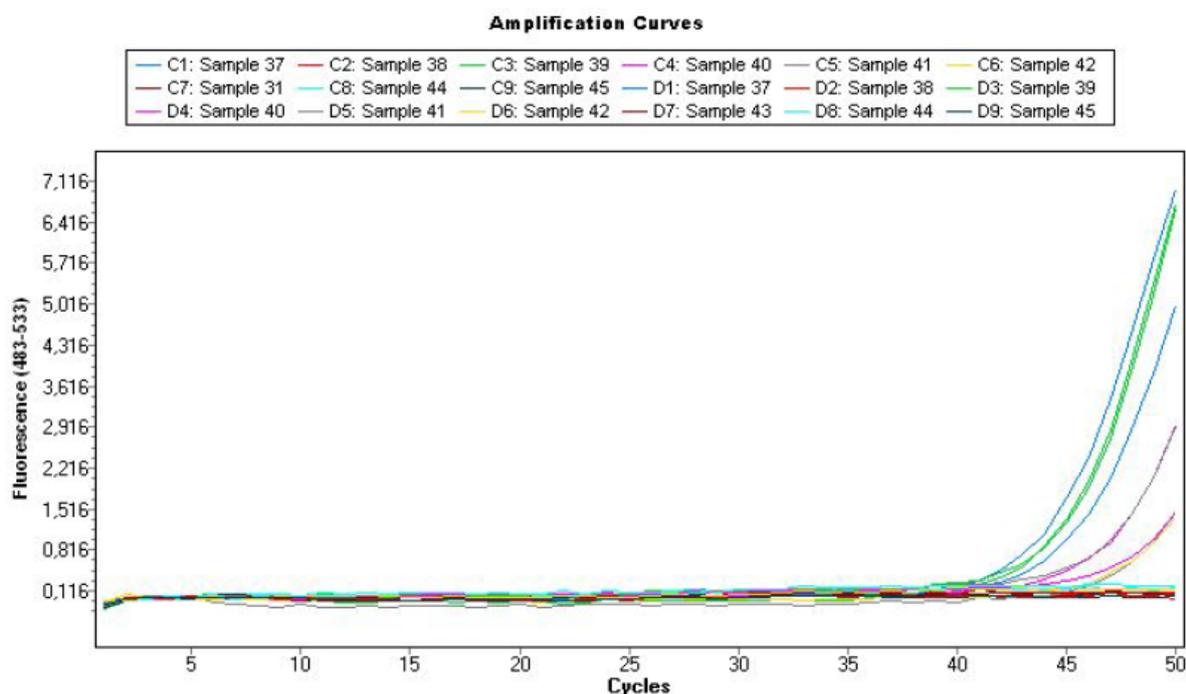


Figure 37 : Courbe d'efficacité de l'amorce apeline: l'amplification d'un pool d'ADNc de 3 groupes (2 échantillons / groupe)

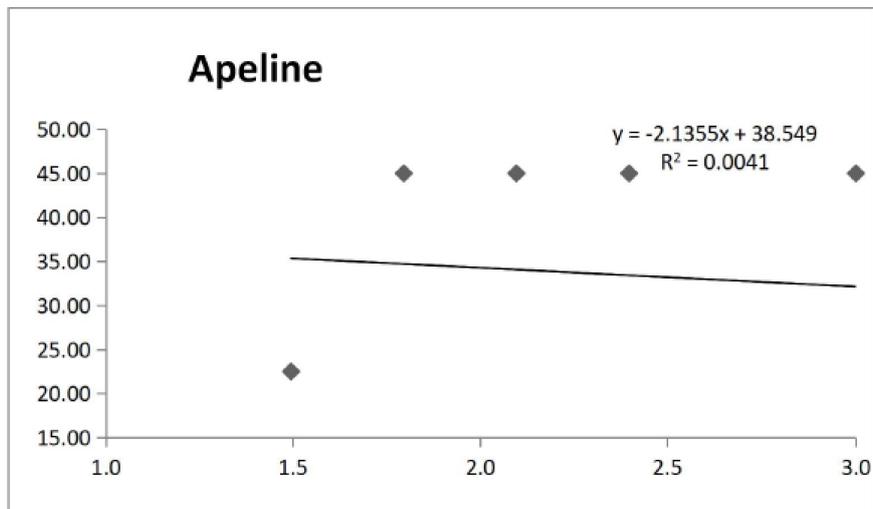
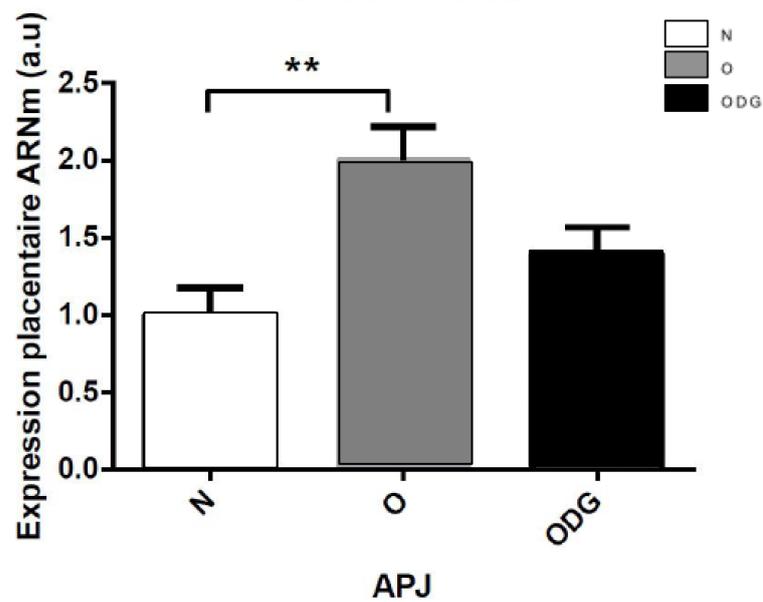


Figure 38 : Expression placentaire d'APJ dans les groupes N, O et ODG (n=20/groupe).



N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel. ** $p < 0,01$.

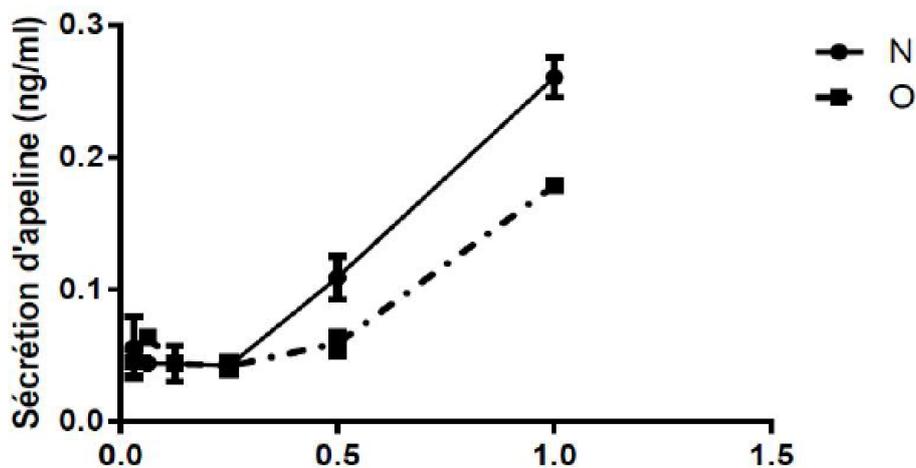
Sécrétion placentaire d'apeline

❖ Recherche d'un phénomène d'inhibition dans le milieu DMEM

Afin de préciser le seuil de dilution optimal pour la réalisation des dosages des sécrétions d'apeline dans le milieu DMEM, nous avons réalisé une plaque de dilution de nos échantillons.

Lorsque le milieu de DMEM contenant les villosités choriales était dilué 2 fois, nous obtenions des concentrations équivalentes à la moitié des dosages pour les prélèvements purs. Pour les dilutions plus poussées, le facteur de dilution n'était pas retrouvé, probablement en raison d'une trop faible concentration en apeline dans le milieu (Figure 39).

Figure 39: Courbe de linéarité du dosage de la sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo chez des patientes d'IMC normal (N, n=4) ou obèses (O, n=4) après 12 heures d'incubation.



Il n'y avait donc pas de phénomène d'inhibition dans le milieu DMEM contenant les villosités choriales en incubation. En raison des faibles concentrations en apeline dans le milieu, nous avons choisi de réaliser les dosages à partir d'échantillons purs, non dilués.

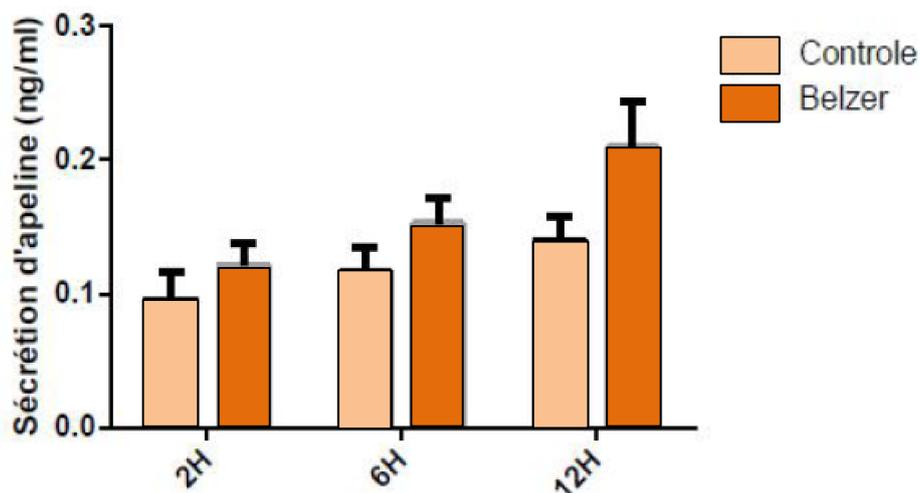
❖ Recherche d'un moyen de différer le dosage des sécrétions : utilisation d'un milieu de conservation tissulaire (Belzer)

L'étude des sécrétions était réalisée sur des placentas frais, dans l'heure suivant l'accouchement.

En raison des horaires aléatoires de l'accouchement et des difficultés évidentes de prélèvement et de dissection pendant la nuit, nous avons testé l'utilisation d'un milieu de conservation tissulaire (Belzer, UW® Cold Storage Solution, USA), utilisé en clinique pour conserver des organes tels que le pancréas ou le foie avant une greffe. Nous avons donc testé ce milieu de préservation sur 6 placentas (2 placentas par groupe) afin de vérifier s'il pouvait être utilisé sans altérer les résultats du dosage des sécrétions.

Nous avons mis en évidence une tendance à l'augmentation de la sécrétion placentaire d'apeline lorsque le Belzer était utilisé en comparaison avec une incubation dans du DMEM seul (H2 : $p=0,42$; H6 : $p=0,24$; H12 : $p=0,09$) (Figure 40).

Figure 40 : Sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo chez $n=6$ patientes dans les 3 groupes à 12 heures d'incubation avec ou sans utilisation du Belzer.

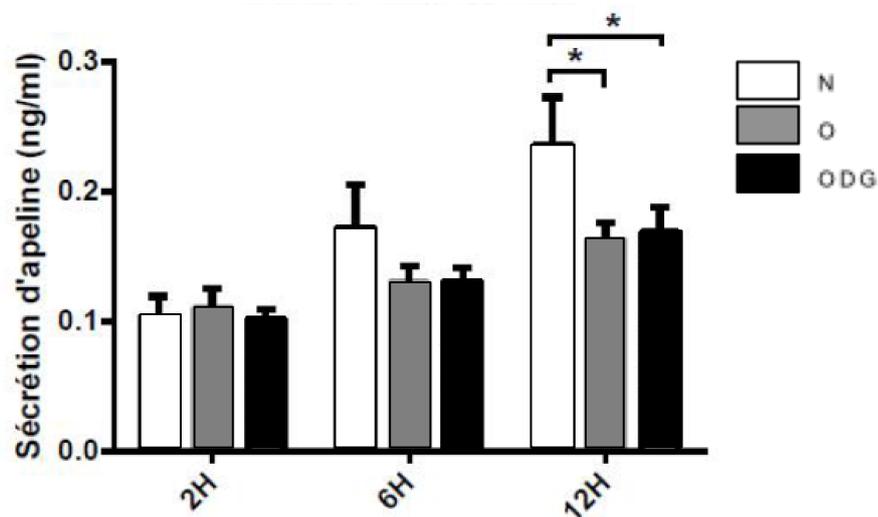


Du fait de ces résultats, nous avons choisi de ne pas utiliser le Belzer pour conserver les tissus avant mise en incubation.

❖ Sécrétion placentaire l'apeline

Il y avait une sécrétion d'apeline par les villosités chorales dans le milieu de culture à H2, H6 et H12 dans les 3 groupes (Figure 41). Les villosités chorales des groupes O et ODG sécrétaient moins d'apeline que les villosités témoins après 12 heures d'incubation ($p < 0.05$).

Figure 41 : Sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo à terme dans les groupes N, O et ODG après 2 heures, 6 heures et 12 heures d'incubation ($n=10$ par groupe).



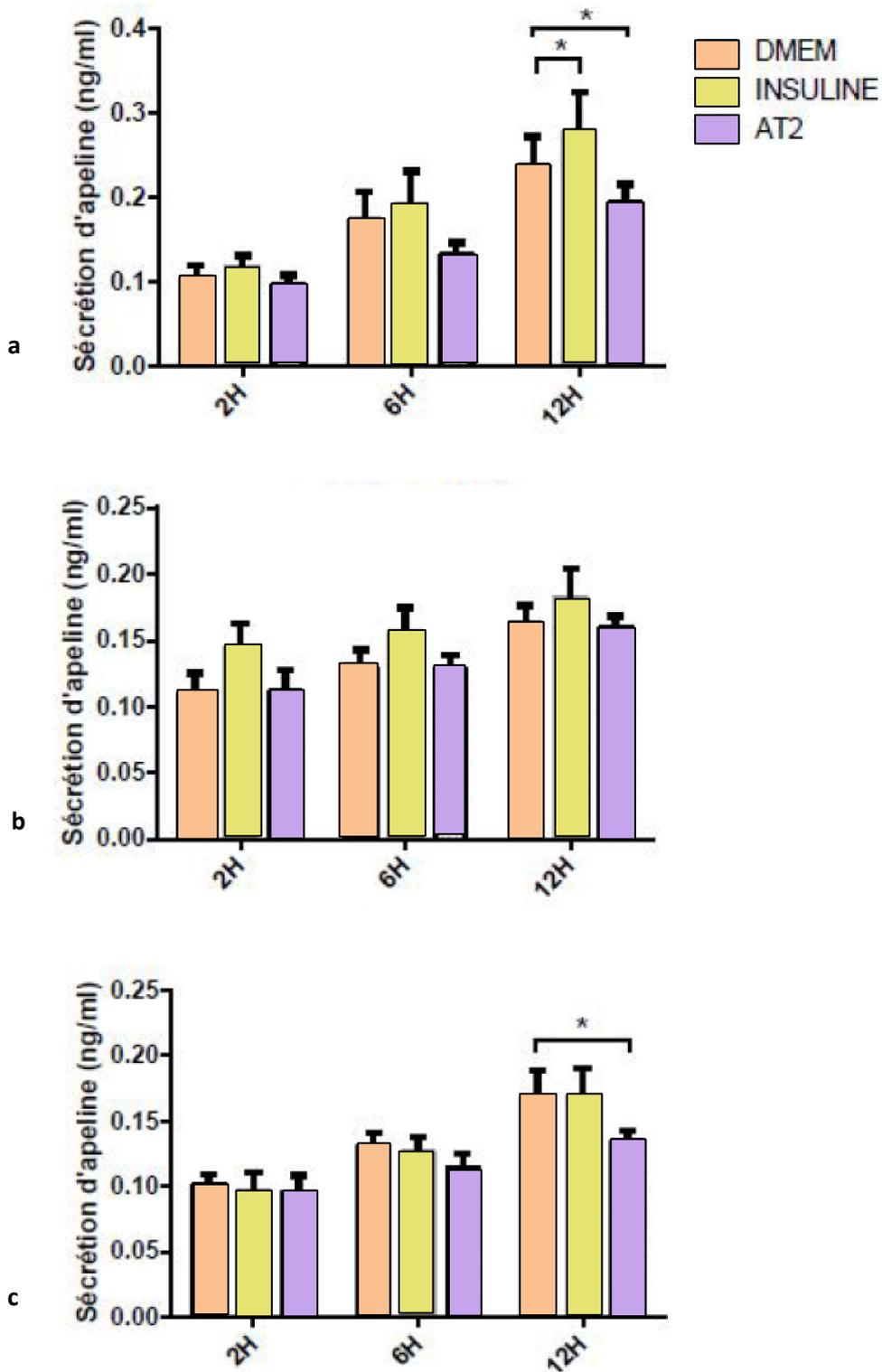
N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel. * $p < 0,05$.

Dans le groupe N, la sécrétion placentaire d'apeline était augmentée en cas d'ajout d'insuline dans le milieu ($p < 0,05$) en comparaison avec le DMEM seul, alors que l'ajout d'AT2 diminuait significativement cette sécrétion ($p < 0,05$) (Figure 42 a).

Ces mêmes données étaient retrouvées chez les patientes du groupe O, sans toutefois que ces variations ne soient significatives (Figure 42 b).

Dans le groupe ODG, il n'y avait pas d'effet de l'insuline sur la sécrétion placentaire d'apeline. Seule une diminution de la sécrétion par l'ajout d'AT2 était retrouvée (Figure 42 c).

Figures 42 a-c : Sécrétion placentaire d'apeline ex-vivo dans le milieu DMEM et après ajout d'insuline ou d'angiotensine 2. a : chez les patientes du groupe N ; b : chez les patientes du groupe O ; c : chez les patientes du groupe ODG (n= 10 par groupe).



N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel ; AT2 : angiotensine 2. * p < 0,05.

Concentrations en apeline dans le colostrum

❖ Recherche d'un phénomène d'inhibition de l'apeline dans le colostrum

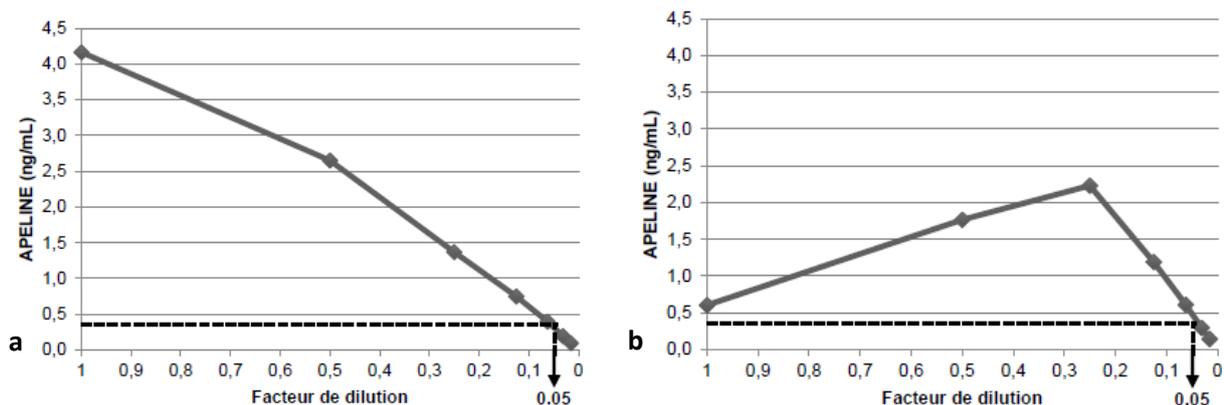
Le colostrum étant très riche en lipides, il était souhaitable qu'il soit dilué pour augmenter la précision des prélèvements. D'autre part, dans une étude réalisée précédemment au sein de notre laboratoire, il avait été mis en évidence un phénomène d'inhibition chez la rate (251).

Afin de vérifier si un tel phénomène était observable chez la femme, nous avons constitué 2 pools de colostrum : un pool N (n=4) et un pool O (n=4).

Dans le groupe N (Figure 43 a), les concentrations obtenues après chaque étape de dilution permettait de retrouver un facteur de dilution proche de 2 [1,57-2,01]. Dans le groupe O (Figure 43b), il y avait un phénomène d'inhibition du dosage lorsque le colostrum était concentré (pur jusqu'à une dilution au 1/8^{ème}). A partir d'une dilution au 1/8^{ème}, la courbe était rectiligne et le facteur de dilution de 2 était retrouvé entre 1/8^{ème} et 1/64^{ème}. Cette caractéristique semblait être spécifique au colostrum des patientes du pool du groupe O.

Les dosages étaient réalisés en triplicats. La variabilité inter-plaque était de 26%.

Figures 43 a-b : Courbe de linéarité du dosage du colostrum. a : chez les patientes du groupe N (n=4) ; b : chez les patientes du groupe O (n=4)



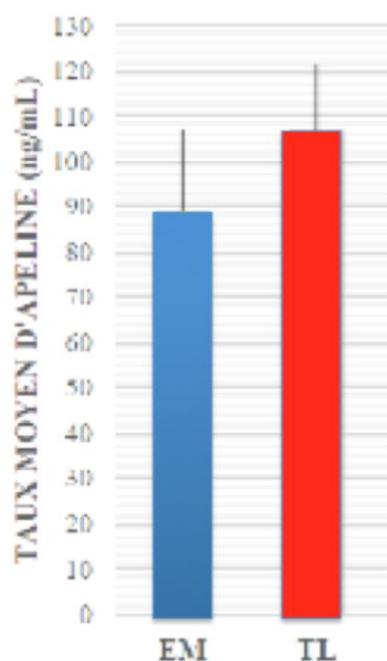
En raison de cet effet d'inhibition, du fait des difficultés de pipetage lié à la grande teneur en lipides du colostrum et des concentrations cibles attendues, nous avons retenu un seuil de dilution de 1/20^{ème} pour la suite des expérimentations.

❖ Recherche d'une influence du mode de recueil du colostrum sur les concentrations en apeline

Nous avons ensuite voulu vérifier si les modalités de recueil du colostrum (tire-lait ou expression manuelle) influençaient les taux d'apeline qu'il contient. Nous avons également voulu déterminer l'acceptabilité de ces 2 modes de recueil par les patientes.

Les concentrations en apeline au 2^{ème} jour du post-partum n'étaient pas influencées par les modalités de recueil (Figure 44).

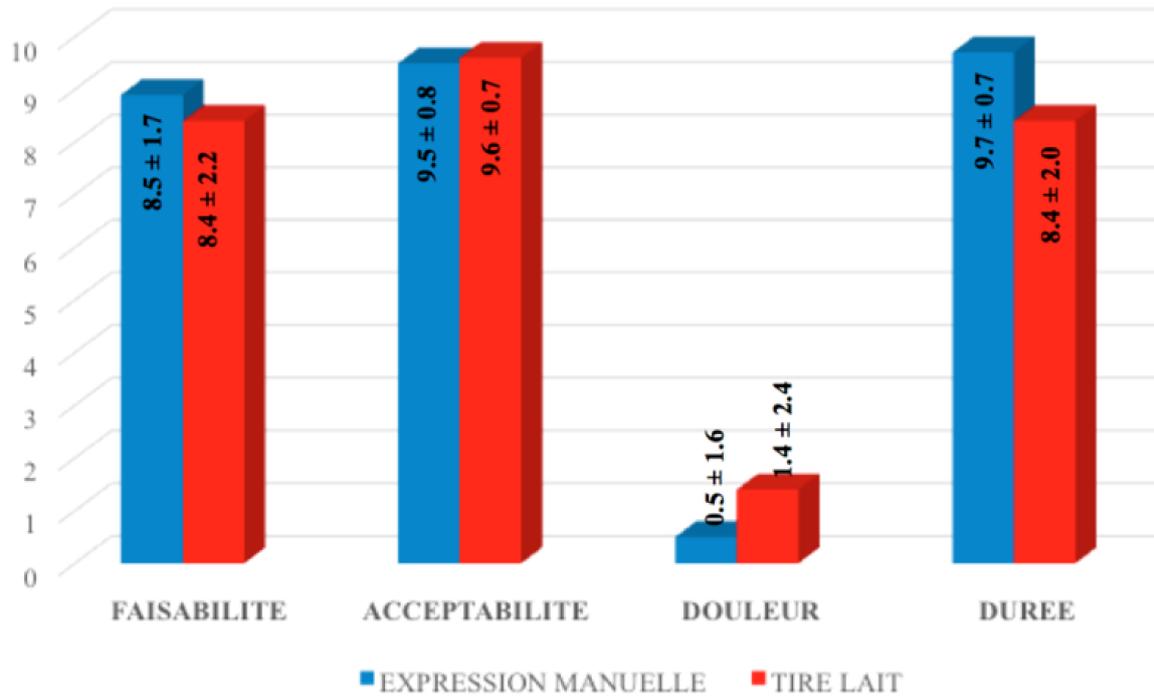
Figure 44 : Concentration moyenne en apeline dans le colostrum chez des patientes de poids normal en utilisant comme mode de recueil soit l'expression manuelle (EM), soit le tire-lait (TL) (n=20/groupe).



La quantité de colostrum recueilli était comparable dans les 2 groupes (379 μ L \pm 381 μ L dans le groupe EM versus 275 μ L \pm 322 μ L dans le groupe TL ; p = 0.93).

L'acceptabilité des 2 modes de recueil était bonne, sans différence entre les groupes (Figure 45). Il n'y avait pas de différence concernant la faisabilité, la douleur ressentie par la patiente au moment du prélèvement et la durée du prélèvement (Figure 45).

Figure 45 : Faisabilité et acceptabilité du prélèvement en fonction du mode de recueil, douleur ressentie au moment du prélèvement et durée du prélèvement (n=20/groupe).



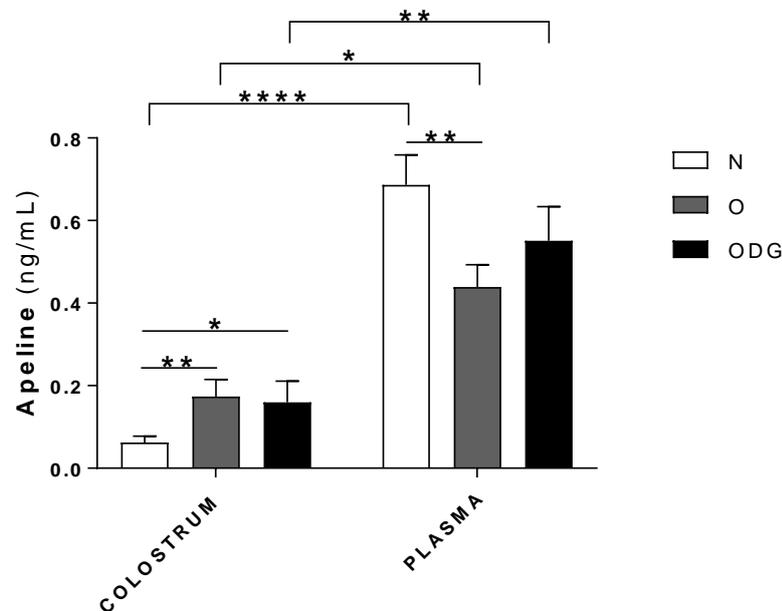
Le mode de recueil n'influençant pas les dosages d'apeline dans le colostrum et l'acceptabilité étant bonne dans les 2 groupes, l'utilisation du tire-lait ou de l'expression manuelle sera par la suite laissée au libre choix de la patiente pour la suite de l'étude.

❖ Concentration en apeline dans le colostrum

Il y avait dans notre étude une augmentation significative des taux plasmatiques d'apeline dans le colostrum des groupes O et ODG, en comparaison avec le groupe N ($p = 0,007$ et $p = 0,05$ respectivement) (Figure 46). Par ailleurs, la concentration en apeline était inférieure dans le colostrum en comparaison avec le plasma (Figure 46).

Il y avait une corrélation positive entre le taux d'apeline dans le colostrum et l'insulinémie ($r = 0,5461$; $p = 0,003$), ainsi qu'avec le taux de peptide C plasmatique ($r = 0,6424$; $p = 0,0003$) en post-partum.

Figure 46 : Taux d'apeline dans le colostrum et dans le plasma en post-partum (N : n=18 ; O : n=11 ; ODG : n=13).



N : patientes avec IMC normal ; O : patientes obèses ; ODG : patientes obèses avec diabète gestationnel. * $p < 0,05$.

DISCUSSION

Dans cette thèse, nous avons montré que le système apelinergique était modulé par l'obésité au cours de la grossesse.

Chez la souris obèse, il y avait au cours de la gestation une diminution de l'apelinémie dans les 2 groupes en fin de gestation, plus marquée dans le groupe HF. L'expression placentaire de l'apeline et d'APJ était augmentée dans les placentas de souris obèses alors que la sécrétion placentaire d'apeline était diminuée.

Chez la femme, l'apelinémie maternelle était diminuée dans les groupes O et ODG en comparaison avec le groupe N aux 3 temps de l'étude. L'apelinémie néonatale était également diminuée dans ces mêmes groupes. Les concentrations en apeline dans le colostrum étaient à l'inverse plus élevées dans les groupes O et ODG que dans le groupe N. *Ex-vivo*, la sécrétion placentaire était diminuée dans les groupes O et ODG en comparaison avec le groupe N. L'ajout d'insuline dans le milieu entraînait une augmentation de la sécrétion d'apeline, alors que l'ajout d'AT2 aboutissait à une diminution de cette sécrétion. L'expression placentaire de l'ARNm d'APJ était plus importante dans les placentas de femmes obèses que chez patientes d'IMC normal (N).

Choix des modèles

Modèle de souris obèse et insulino-résistante

La souche de souris choisie dans cette étude (C57Bl/6) est celle le plus couramment utilisée pour étudier les désordres métaboliques (252). Plusieurs travaux ont démontré que la consommation chronique d'un régime hyperlipidique chez les rongeurs entraînait l'apparition d'une obésité et de ses complications (253,254). Notre étude confirme ces résultats puisque nous avons montré que la consommation d'une telle alimentation entraînait une obésité importante, et ce rapidement et avec un régime modérément hyperlipidique (45% de lipides et 35% d'hydrates de carbone). La différence de poids s'observait dès 40 jours de régime et après 3 mois, les souris étaient intolérantes au glucose. L'augmentation de la masse grasse a été confirmée lors du sacrifice où on notait une augmentation des dépôts adipeux péri-rénal et péri-gonadique chez les souris HF ($P < 0.05$). L'augmentation du poids corporel est donc en lien avec une augmentation des dépôts adipeux, ce qui atteste de l'obésité chez les souris du groupe HF.

Les souris HF étaient intolérantes au glucose car elles avaient une OGTT perturbée avec notamment une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun (253,254), et elles présentaient une insulino-résistance (HOMA-IR, $P < 0.01$). Toutefois, elles n'étaient pas diabétiques car leur glycémie à jeun restait inférieure à 2.50 g/L (252).

Ce modèle animal d'obésité s'approche de ce que nous observons actuellement chez l'Homme dans les pays développés. En effet, l'obésité obtenue par un régime hyperlipidique s'approche de l'alimentation de grand nombre de sujets obèses et en est plus proche que les modèles obtenus par injection chimique, par manipulation chirurgicale, par mutation spontanée ou par génie génétique (254).

Toutefois, chaque espèce présente des spécificités et les modèles murins ne peuvent pas permettre à eux seuls de conclure sur des mécanismes de régulation chez l'humain, notamment en ce qui concerne le métabolisme énergétique. Nous avons donc dans un second temps mené une étude chez la femme afin de vérifier si les résultats obtenus chez la souris étaient retrouvés dans l'espèce humaine.

Etude chez l'humain: la femme obèse

Plusieurs éléments rendent la comparaison complexe entre l'étude dans le modèle murins et les données issues de l'étude chez la femme obèse.

En effet, plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'obésité chez la femme, et pas seulement les facteurs nutritionnels. En effet, d'autres facteurs interviennent, tels que la génétique, l'activité physique, le stress ou encore le microbiote (18,20).

Par ailleurs, la plupart des femmes enceintes se sentent responsable de la santé de leur fœtus et adoptent ainsi une meilleure hygiène de vie durant cette période. Ainsi, nombreuses d'entre elles présentent une prise de poids limitée au cours de la grossesse, voire perdent du poids. Cela s'oppose donc en partie au modèle murin utilisé, où les souris poursuivaient leur régime hypercalorique au cours de la gestation.

Enfin, les souris étaient intolérantes aux hydrates de carbone. Chez les femmes obèses, toutes ne développent pas de DG au cours de la grossesse. L'objectif de notre étude chez la femme étant d'étudier l'impact de l'obésité, nous avons donc réalisé 2 groupes selon l'IMC de la patiente, sans DG.

Plusieurs études dans la littérature présentent des résultats contradictoires en cas d'obésité et de diabète. Afin de préciser l'impact du diabète gestationnel dans les modifications observées chez la femme obèse, nous avons donc créé un 3^{ème} groupe de patientes obèses avec un DG.

Enfin, il est intéressant de remarquer que les patientes des groupes N et ODG ont été incluses respectivement en 10 et 13 mois, mais qu'il aura fallu 16 mois pour inclure l'ensemble des patientes du groupe O. Il y avait dans cette population une plus grande réticence à participer à l'étude, probablement du fait qu'elles ne se sentaient pas malades, contrairement aux patientes du groupe ODG, et qu'elles ne souhaitent peut-être pas être catégorisée dans le groupe de femmes « obèses ». La principale raison évoquée pour leur refus était leur impossibilité de se rendre à jeun pour réaliser les prélèvements. Il serait intéressant d'étudier plus précisément les raisons du plus grand nombre de refus de participation aux recherches médicales de ces patientes.

Facteurs pouvant influencer les dosages plasmatiques d'apeline chez la souris

Nos résultats montraient qu'il n'y avait pas de variation significative de l'apelinémie en fonction du cycle œstral chez la souris femelle, suggérant l'absence d'implication des hormones gonadiques dans la régulation de l'apeline plasmatique chez la souris femelle. En dehors de la gestation, il ne semblait donc pas nécessaire de réaliser des frottis vaginaux pour déterminer la période du cycle œstral dans laquelle la souris se trouve avant de doser l'apeline plasmatique. Nous avons donc pu nous affranchir de la réalisation de frottis vaginaux chez les souris femelles non gestantes dans la suite de l'étude.

Les variations nyctémérales n'étaient pas en faveur d'un rythme circadien chez les souris femelles. Toutefois, il y avait un pic à 16h chez les souris témoins. Cependant, celui-ci est relativement modéré (x1.4 par rapport au taux basal), sans aucune commune mesure avec les pics que l'on peut observer pour d'autres hormones, comme pour les glucocorticoïdes par exemple (x4 par rapport au taux basal pour le cortisol (255)). Duparc, *et al.* (99) avait montré qu'il y avait un pic d'apelinémie au cours de la phase nocturne chez les souris mâles témoins. Chez les souris mâles obèses, il avait retrouvé une altération du rythme circadien. En effet, il avait mis en évidence une augmentation de l'apelinémie basale d'un facteur 2 et une inversion du rythme nyctéméral de l'apeline, à savoir un pic au début

de la phase diurne. Toutefois, l'amplitude de ce pic correspond à un facteur 1.6, ce qui est comparable au pic retrouvé dans notre série, soit un pic de faible amplitude. Dans notre série, à l'inverse de Duparc, *et al.* (99), c'est au cours de la phase diurne que nous avons retrouvé une élévation de l'apeline plasmatique. Cependant, certaines différences existent entre ces 2 études, pouvant expliquer ces variations : dans l'étude présentée dans cette thèse, les prélèvements étaient réalisés chez des souris femelles, alors que Duparc, *et al.* utilisait des souris mâles. De nombreuses hormones présentent un dimorphisme sexuel. Concernant l'apeline, il a été montré qu'il existait un dimorphisme sexuel quant à l'expression de l'apeline et de son récepteur APJ dans les tissus chez la souris (46). D'autre part, Duparc, *et al.* avait mené son étude en rythme lumineux inversé, tandis que la notre était en rythme lumineux normal. Ces différences peuvent entraîner des modifications des hormones soumises aux variations du cycle circadien. Enfin, dans ces 2 études, les souris étaient nourries *ad libitum*, or il a été démontré que le statut nutritionnel influait nettement sur les taux plasmatiques d'apeline (48), et cela pourrait être une autre explication à ces variations.

Compte tenu du doute qu'il existe sur les variations de l'apelinémie en fonction du rythme nyctéméral, nous avons préféré réaliser les dosages d'apeline plasmatique à heure fixe et nous avons donc réalisé l'ensemble des prélèvements de notre étude à 8h, afin de s'affranchir des potentielles variations nyctémérales de l'apeline.

Le seul critère influant significativement sur les résultats du dosage de l'apelinémie était le statut nutritionnel, ce qui avait déjà été montré dans la littérature. En effet, Boucher, *et al.* avait montré que l'insuline régulait positivement la production d'apeline *in vivo* et *in vitro* (48), ce qui est concordant avec le fait que lorsque les souris étaient nourries *ad libitum*, elles présentaient une apelinémie plus élevée. Nous avons donc, pour la suite des expériences, réalisé nos prélèvements chez des souris à jeun depuis 6 heures.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi d'effectuer l'ensemble des prélèvements de notre étude à heure fixe, à 8 heures du matin, chez des souris à jeun depuis 6 heures, sans tenir compte de leur période du cycle œstral.

Apelinémie et gestation

- **Evolution de l'apelinémie au cours de la gestation**

Diminution de l'apelinémie en fin de gestation

Chez la souris, nous avons montré que l'apelinémie maternelle était diminuée en fin de gestation (E18.5) en comparaison avec la souris non gestante ou en début de gestation (E6.5 et E12.5). Cette diminution pourrait être liée soit à une diminution de la synthèse d'apeline, soit à une destruction plus rapide de celle-ci dans ces conditions. L'apeline circulante provient de la synthèse de la sécrétion de l'ensemble des organes du corps, dont le placenta et le tissu adipeux. Une diminution de la synthèse d'apeline par un ou plusieurs organes en fin de gestation pourrait expliquer la diminution des taux plasmatiques d'apeline. Kourtis, *et al.* avaient montré que chez la femme, l'apelinémie au 2^{ème} trimestre de la grossesse (24-28 SA) était significativement diminuée en comparaison avec des femmes non enceintes (76). Van Mieghem, *et al.* avait montré qu'il existait également une diminution de l'apelinémie en fin de gestation chez la rate (d'un facteur 2 entre E14 et E22) et que celle-ci était probablement en lien avec une augmentation de l'ACE2 au niveau placentaire, l'ACE2 étant une enzyme catalysant l'apeline (150).

Dans notre étude chez la souris, il y avait une augmentation de l'apelinémie à E12.5 chez les souris de poids normal en comparaison avec les souris non gestantes. Cette élévation de l'apeline plasmatique était associée à la majoration de l'insulino-résistance à E12.5. Chez la femme de poids normal, Kourtis, *et al.* avaient montré que l'apelinémie diminuait en milieu de grossesse, à 24-28 SA (236) et Van Mieghem, *et al.* avait mis en évidence une diminution des taux d'apeline plasmatique au 2^{ème} trimestre de la grossesse, suivie d'une augmentation au 3^{ème} trimestre (152). Toutefois, cette dernière étude incluait un faible nombre de patientes (n=8). Il existe donc probablement des variations inter-espèces des taux d'apeline plasmatique chez l'individu de poids normal. D'autres études sont encore nécessaires pour tenter d'expliquer ces variations afin de mieux comprendre les mécanismes de ces modulations au cours de la grossesse.

Dans notre étude OB-APE, nous n'avons pas de données concernant les femmes en dehors de la grossesse. En effet, les patientes étaient incluses entre 35 et 40 SA, après le dépistage du diabète gestationnel lors du 2^{ème} trimestre de la grossesse afin de limiter les erreurs d'inclusion dans les groupes O et ODG. Une inclusion des patientes en début de grossesse voire en pré-conceptionnel était difficilement envisageable du fait que le début de suivi de grossesse a le plus souvent lieu en ville et que les patientes consultent pour la première fois à l'hôpital vers le 6^{ème} mois de grossesse.

Augmentation relative des taux plasmatiques d'apeline en post-partum par rapport à la fin de la grossesse

Chez la femme, nous avons montré que, en post-partum, les taux plasmatiques d'apeline étaient augmentés par rapport à la fin de la grossesse. Il pourrait donc s'agir soit d'une diminution de l'apelinémie en fin de grossesse avec un retour aux taux initiaux en post-partum, soit d'une augmentation de l'apelinémie après l'accouchement.

Nous avons vu précédemment que de nombreux auteurs suggèrent qu'il y ait une diminution de l'apelinémie en fin de gestation, que ce soit chez l'animal (102,150,153) ou chez la femme (152,236).

Les taux pourraient également réaugmenter après l'accouchement, possiblement du fait de l'évacuation du placenta. En effet, Van Mieghem, *et al.* avait émis l'hypothèse que la diminution de l'apelinémie en fin de gestation était en lien avec une dégradation de celle-ci au niveau placentaire par l'ACE2 (150). Afin d'explorer cette hypothèse, nous envisageons de doser la concentration des enzymes de dégradation de l'apeline (ACE2 et PRCP) dans les placentas de notre étude.

D'autre part, la relative augmentation de l'apelinémie après l'accouchement chez la femme pourrait potentiellement être en lien avec la mise en route de la lactation. En effet, la glande mammaire sécrète de l'apeline et celle-ci est très augmentée lors de la mise en route de la lactation (61). L'apeline est ensuite retrouvée dans le colostrum (61,199,200), puis dans le lait mature. Elle pourrait ainsi gagner la circulation du nouveau-né via son passage à travers la muqueuse intestinale (251).

- **Apelinémie et obésité**

Dans notre étude chez la souris, il y avait une augmentation de l'apelinémie à E12.5 en comparaison avec les souris non gestantes. Cette élévation de l'apeline plasmatique était associée à la majoration de l'insulino-résistance chez les souris HF. Il y avait donc chez les souris obèses une altération du métabolisme glucidique à E12.5, associée à une augmentation de l'apelinémie. Chez la femme, il y avait également une augmentation de l'ensemble des paramètres glucidiques dans les groupes O et ODG en fin de grossesse en comparaison avec le groupe N, témoignant d'une insulino-résistance plus marquée chez les sujets obèses (groupes O et ODG). Par ailleurs, ces paramètres diminuaient en post-partum dans l'ensemble des groupes.

Il existe une insulino-résistance physiologique au cours de la grossesse, et notre étude tend à

démontrer que cette particularité de la grossesse tend à s'améliorer rapidement après l'accouchement. Il existait une corrélation entre l'apeline et la glycémie à jeun, le peptide C et l'HOMA-IR en fin de grossesse. Toutefois, celle-ci était faible ($r=-0.34$, -0.32 et -0.26 respectivement) et il n'y avait pas de différence d'apelinémie entre les groupes O et ODG dans notre étude. Les données de la littérature quant au DG sont controversées. Deux études retrouvaient un taux d'apeline plasmatique maternelle non affecté par le DG (179,187), une étude trouvait une augmentation (177) et une autre montrait une réduction (227) de ce taux. Telejko, *et al.* a comparé des femmes de poids normal, avec et sans DG. Il n'a pas mis en évidence de différence significative des taux circulants d'apeline ou d'expression placentaire de l'apeline et de son récepteur APJ entre les 2 groupes (187). Ceci pourrait être lié au fait que la grossesse physiologique est considérée comme une période de diminution de l'insulino-sensibilité (245,256,257) avec notamment une augmentation de l'insulinémie (76,256), ce qui tend à diminuer la différence entre ces deux groupes.

Ainsi, il semble qu'en cas de DG, l'apelinémie soit modulée différemment en cas de résistance à l'insuline et d'hyperglycémie chronique chez les mères, alors que chez les femmes adultes non enceintes, l'apelinémie augmente en cas de diabète. Ainsi, la grossesse peut représenter un intervalle de temps spécifique où le taux d'apeline circulant peut être régulé d'une manière spécifique pour assurer un développement adéquat du placenta. Il se pourrait donc que l'augmentation de l'apelinémie soit une des conséquences de l'insulino-résistance. Par ailleurs, Sörhede Winzell, *et al.* avaient montré que l'apeline inhibait la sécrétion pancréatique d'insuline (98). On pourrait donc également penser que l'apeline augmente au cours de la gestation dans le but d'améliorer l'insulino-sensibilité (52). Il pourrait s'agir d'un mécanisme de protection physiologique contre l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie pendant la gestation, notamment en cas d'obésité (98).

Dans notre étude sur le modèle murin, nous avons montré que l'apelinémie était augmentée à E18.5 en cas d'obésité. A l'inverse, il y avait chez la femme au 3^{ème} trimestre de la grossesse une diminution de l'apelinémie chez les patientes ayant un IMC $> 30 \text{ kg/m}^2$ en comparaison avec les patientes ayant un IMC normal. Toutefois, ces 2 modèles sont très différents, surtout en ce qui concerne l'étude du métabolisme. Chez les mammifères, la placentation se fait par la fusion des membranes fœtales avec la muqueuse utérine. Il en résulte le développement d'échanges materno-fœtaux qui permettent ainsi le développement fœtal. Selon les espèces, le placenta diffère énormément. Le placenta humain est de type hémochorial et est caractérisé par une réaction déciduale globale et une invasion

du trophoblaste qui est maximale. Il est siège d'une synthèse hormonale très importante, contrairement au placenta murin (258). Le placenta murin est basé sur la destruction de l'endomètre et des vaisseaux maternels par le trophoblaste, aboutissant également à la formation d'un placenta de type hémochorial, appelé labyrinthe, où le trophoblaste est directement baigné dans du sang maternel. Chez les petits rongeurs, l'invasion semble restreinte puisque dans la zone de contact entre le trophoblaste et la décidue, les trophoblastes ne se présentent pas sous la forme de cellules dispersées mais forment une bordure continue de cellules géantes (259).

Par ailleurs, les souris obèses étaient insulino-résistantes et intolérantes aux hydrates de carbone et poursuivaient leur régime hypercalorique au cours de la gestation, alors que les femmes du groupe O n'avaient pas de DG et avaient une prise de poids limitée du fait de l'application des règles hygiéno-diététiques recommandées. La diminution des paramètres lipidiques observée chez les individus obèses de notre étude pourrait s'expliquer par la prise en charge diététique spécifique à ces groupes afin de limiter leur prise pondérale. Ces mesures semblaient efficaces chez nos patientes, comme en témoignait une prise de poids plus faible dans ces groupes (+11,80 kg \pm 3,60 kg dans le groupe N, +7,87 \pm 9,24 dans le groupe O et + 7,87 \pm 7,38 kg dans le groupe ODG ($p < 0.05$)).

Les patientes du groupe N présentaient un bilan lipidique perturbé, ce qui est habituel chez les femmes au cours de la grossesse (260). Les patientes obèses avaient des marqueurs lipidiques abaissés par rapport aux patientes du groupe N. Chez les femmes enceintes obèses, il est habituel d'observer une augmentation du cholestérol total et des triglycérides (260). Peu d'études se sont intéressées à la relation entre l'apeline et les lipides. L'apeline inhiberait la lipolyse via Gq, Gi et l'AMPK (106,107). Toutefois, sur des cultures tissulaires ou cellulaires d'adipocytes, cet effet sur la lipolyse n'a pas été retrouvé (261). Les effets sur la lipolyse ont été retrouvés *in vivo* chez la souris. Higuchi, *et al.* a montré qu'en cas d'injection chronique d'apeline à une souris obèse et insulino-résistante, il y avait une diminution du cholestérol total et des triglycérides (262). L'apeline pourrait donc être une hormone bénéfique permettant d'améliorer les paramètres lipidiques.

Les femmes de poids normal ont une modification de leur métabolisme au cours de la grossesse qui aboutit au stockage des réserves énergétiques (lipogénèse) en vue de l'allaitement. Chez les femmes obèses, ces réserves sont déjà constituées et il serait donc moins important pour leur tissu adipeux de stocker des réserves. Cela aboutirait à une lipolyse chronique chez ces individus. Il a été montré récemment que l'apeline inhibait la lipolyse (106). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que cette lipolyse accrue chez les femmes obèses pourrait en partie expliquer les variations de l'apelinémie

dans cette population. Nous envisageons par la suite de doser dans le plasma le glycérol et des acides gras libres afin de vérifier cette hypothèse.

Il existe encore de nombreuses incertitudes concernant le rôle des variations de l'apelinémie en dehors et au cours de la gestation. D'autres études sont encore nécessaires afin de mieux connaître ses mécanismes de régulation et de comprendre si l'hyperapelinémie est la cause ou la conséquence de l'hyperinsulinémie.

Apelinémie chez le nouveau-né

Chez les souris, il y avait à E18.5 des taux d'apeline plasmatique plus élevés que chez les mères (x4 pour le groupe T ($P<0.05$), x6 pour les HF ($P=0.2$)), confirmant les résultats de Malamitsi-Puchner *et al.* (97). Dans une précédente étude chez le rat, dans un modèle L-NAME, notre équipe avait montré des taux d'apeline plasmatiques similaires entre les rates et leurs ratons à E21 (211), suggérant une différence inter-espèces du système apelinergique. Ainsi, chez la femme, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les taux d'apeline plasmatiques maternel et néonatal.

Les données de la littérature sont très controversées chez l'humain, puisque Malamitsi-Puchner, *et al.* avait retrouvé des taux d'apeline 2 fois plus élevés dans le plasma des nouveau-nés que dans celui de leurs mères (97), alors que Aslan, *et al.* retrouvaient l'inverse (nouveau-nés : 8.2 ± 1.9 ng/ml vs mères : 9.6 ± 5.9 ng/ml) et notamment en cas de diabète gestationnel (8.8 ± 4.3 ng/ml vs 13.5 ± 8.3 ng/ml) (177). Toutefois, ces 2 études comportaient un faible nombre de patientes (n=40 et n=30 respectivement) (97,177).

Dans la série de Aslan, *et al.*, le prélèvement maternel était réalisé à jeun après la naissance de l'enfant et avant la délivrance placentaire (177). Comme nous l'avons montré dans la première partie de cette thèse, le statut nutritionnel joue un rôle important sur les concentrations plasmatiques d'apeline. Dans notre série, les patientes avaient la possibilité de s'alimenter au cours du travail et n'étaient donc pas nécessairement à jeun au moment du prélèvement. D'autre part, Aslan, *et al.* ne dosait que l'apeline-36, quand dans notre étude nous dosions l'ensemble des isoformes, rendant toute comparaison difficile.

Dans l'étude de Malamitsi-Puchner, *et al.*, le prélèvement sanguin maternel était réalisé en début de

travail (97). Cela n'avait pas d'influence pour les patientes ayant eu une césarienne programmée, mais cela pourrait avoir une influence sur l'apelinémie de celles ayant eu un accouchement par voie basse. En effet, non seulement le prélèvement cordonal pouvait être différé de plusieurs heures par rapport à celui de la mère, mais en plus, il a été montré que l'apeline jouerait un rôle dans la contractilité myométriale (28,263). Ainsi, il a été montré *in vitro* que l'augmentation de la concentration d'apeline dans un milieu inhibait la contraction myométriale (264) et que la concentration en apeline dans les membranes fœtales diminuait après travail en comparaison avec des césariennes programmées (265). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il y ait une diminution de l'apelinémie en fin de grossesse pour permettre la mise en route du travail, puis il y aurait une augmentation de l'apelinémie au cours du travail pour permettre ainsi augmentation de l'utilisation du glucose par le muscle (51) et une meilleure contractilité musculaire. D'autres études sont donc nécessaires afin de comprendre les modulations de l'apelinémie selon la présence ou non de contractions utérines et le rôle de celle-ci sur la mise en route et l'entretien du travail.

Dans les 2 études précédemment citées et dans OB-APE, les enfants naissaient par voie basse ou par césarienne. Toutefois, dans les études de Malamitsi-Puchner, *et al.* et de Aslan, *et al.*, la voie d'accouchement des patientes n'était pas précisée, or l'apelinémie pourrait être influencée par ces données. Nous avons donc voulu vérifier ce paramètre chez les femmes de notre étude, et nous n'avons pas retrouvé de différence entre les patientes selon leur voie d'accouchement ($p=0.92$, $P=0.23$ et $p=0.27$ dans les groupes N, O et ODG respectivement).

Enfin, Malamitsi-Puchner, *et al.* a montré que chez le nouveau-né, il y avait une diminution des taux d'apeline plasmatiques à J1 (97), suggérant que le placenta pourrait être une source d'apeline pour le fœtus.

Système apelinergique et placenta

- **Apeline et placenta**

Nous avons montré qu'il y avait une expression de l'apeline et de son récepteur APJ dans les villosités choriales à E18.5 chez la souris et d'APJ à terme chez la femme. Dans la littérature, il a été montré que le placenta exprimait une grande quantité d'apeline, aussi bien chez le rongeur (102,153) que chez l'Homme (152,155) et cette expression serait modulée au cours de la gestation (102). Chez le rat, les taux placentaires de l'ARNm de l'apeline sont élevés et stables entre E13 et E17 et diminuent

ensuite jusqu'à terme (102). L'expression placentaire d'APJ subit une augmentation de E13 à E17 puis une diminution jusqu'à E21 (102). L'apeline pourrait permettre, en début de gestation, de favoriser l'implantation de l'embryon grâce à son effet angiogénique. Elle pourrait par la suite favoriser les échanges maternels-fœtaux d'oxygène et de nutriments (266). L'apeline permettrait également de contrôler l'homéostasie fœtale du glucose (102). Chez la femme, il y aurait une légère diminution de l'expression de l'apeline entre le 1^{er} et le 3^{ème} trimestre de la grossesse tandis qu'APJ augmente au 3^{ème} trimestre (155).

Nous avons également montré qu'il y avait une sécrétion d'apeline par le placenta de souris à E12.5 et à E18.5 et chez la femme à terme, avec une diminution de la sécrétion en fin de gestation. La sécrétion placentaire d'apeline varie donc en parallèle des concentrations plasmatiques, comme cela avait été montré chez le rat (102). Chez le rat, la diminution de l'apelinémie chez les femelles à terme a été rapportée comme étant en lien avec une augmentation de la clairance de l'apeline par ACE2 (150). En effet, ACE2 catalysant l'apeline, cela pourrait expliquer la diminution de l'apelinémie dans les 2 groupes en fin de gestation. D'autre part, Van Mieghem, *et al.* a constaté qu'une réduction fœto-placentaire augmentait considérablement les taux d'apeline plasmatique maternelle chez les rates (150). Ainsi, la sécrétion de l'apeline placentaire ne semble pas être impliquée de manière importante dans le pool d'apeline circulant maternel et son origine plasmatique semble donc dépendre d'autres organes.

Les voies de dégradation placentaires de l'apeline ne sont pas complètement caractérisées. Chez le rat, l'ACE2 pourrait être impliquée (150), et chez l'Humain, PRCP pourrait également inactiver la (Pyr1)apeline-13 (160). ACE2 appartient au système rénine-angiotensine (SRA) et, en plus d'inactiver l'apeline, elle hydrolyse l'AT2 (151). Une caractéristique essentielle émergente du système apelinergique dans le placenta est son interaction avec le SRA. O'Carroll, *et al.* a montré que l'apeline avait un effet inotrope positif sur le cœur et vasodilatateur dans la circulation périphérique, due à la libération de NO (47). Par ailleurs, nous avons montré qu'il y avait une diminution de la sécrétion d'apeline par les villosités chorales en présence d'AT2 dans le milieu. Le système apelinergique serait donc également un régulateur négatif de l'action de l'AT2, grâce à la formation d'hétérodimères avec AT1 et à des modifications de la voie de signalisation d'AT2 (161). L'ACE2 est localisé à proximité des composants du système apelinergique et du SRA placentaire (150), ces deux systèmes pourraient donc exercer localement des actions opposées sur la tension artérielle et le tonus vasculaire dans le

placenta (150,267,268). De plus, Yamaleyeva, *et al.* a démontré récemment que dans les villosités chorales l'AT2 diminue la sécrétion d'apeline tandis que le blocage d'AT1 augmente cette sécrétion (146). Le système apelinergique et le SRA pourraient donc moduler l'implantation et la vascularisation placentaires au cours de la grossesse. Leurs actions étant opposées à ce niveau, l'action simultanée de ces 2 systèmes permettrait une régulation fine de la vascularisation placentaire.

- **Apeline et placenta en cas d'obésité**

Nous avons montré qu'il y avait, en cas d'obésité, une surexpression de l'apeline et de son récepteur APJ dans les villosités chorales à E18.5 chez la souris et d'APJ à terme chez la femme. Dans nos 2 modèles, la sécrétion placentaire d'apeline était diminuée à terme en cas d'obésité. Il pourrait donc s'agir soit d'un défaut de synthèse placentaire d'apeline (modifications post-traductionnelles, dégradation au sein des villosités chorales, séquestration intra-cytoplasmique), soit d'une modification de l'action locale de l'apeline au niveau du muscle utérin et des membranes fœtales (action paracrine ou autocrine), plutôt qu'un défaut de sécrétion en dehors des villosités chorales. En effet, l'insuline est connue pour être un sécrétagogue de l'apeline dans le tissu adipeux (56). D'après les résultats de notre étude, cette action est confirmée dans les villosités chorales, mais cette augmentation de la sécrétion placentaire d'apeline n'était pas associée à une augmentation de l'apelinémie chez les femmes obèses et insulino-résistantes, laissant présumer que le placenta ne serait pas la principale source d'apeline dans la plasma en cas d'obésité, ou que l'apeline serait plus dégradée dans ces conditions.

Il existe par ailleurs probablement une augmentation de l'activité locale de l'apeline au niveau des villosités chorales à terme qui pourrait expliquer, du moins en partie, le défaut de contractilité myométriale chez ces femmes obèses, puisque l'apeline est connue pour inhiber les contractions utérines (28,183,264).

L'altération de la sécrétion d'apeline dans le placenta des patientes obèses pourrait être secondaire à l'existence d'anomalies placentaires. Des études sur l'effet l'obésité maternelle ont mis en évidence que l'obésité maternelle crée un environnement *in utero* qui altère le transcriptome placentaire, y compris les gènes de l'inflammation et les réponses immunitaires, le métabolisme lipidique, les voies

cancéreuses, l'angiogenèse et la voie de signalisation des récepteurs des glucocorticoïdes (269). Dans un modèle de DG chez la rate, il a été montré que le DG conduisait une altération placentaire par une augmentation du stress oxydatif et une réduction de l'expression de PPAR α et PPAR γ (270). L'obésité maternelle et le DG ont donc un effet négatif sur le développement et la fonction placentaires, et ils influencent négativement la programmation de descendance.

Enfin, l'apeline pourrait moduler le transport des nutriments à travers la barrière hémoplacentaire (150). Le placenta étant l'intermédiaire entre la mère et son fœtus, des altérations à ce niveau pourraient participer à la programmation fœtale pathologique observée chez les enfants de mères obèses (170).

Apeline et colostrum

Les complications périnatales en lien avec l'obésité ne cessent pas avec la naissance de l'enfant et pourraient continuer à avoir un impact sur l'enfant après la naissance. La nutrition au cours des premières semaines de vie est essentielle dans la programmation du développement de pathologies à l'âge adulte (271). C'est le concept développé par la DoHAD (15,127). Pour ces raisons, l'allaitement maternel est recommandé et joue un rôle important pour contrer les effets négatifs de cette programmation. Le lait comporte des molécules et des hormones régulant la prise alimentaire de l'enfant, mais ces mécanismes ne sont pas encore clairement élucidés.

Parmi ces hormones, l'apeline a été retrouvée dans le colostrum et dans le lait mature, chez l'animal (61) et chez la femme (199). Son expression augmente progressivement dans la glande mammaire de rate jusqu'à l'accouchement, puis rediminue ensuite progressivement (61). Chez la vache, la concentration en apeline est très élevée dans le colostrum, puis diminue rapidement dès les premiers jours de lactation (61). Chez la femme, Aydin, et al. avait mis en évidence une diminution de l'apeline dans le colostrum et dans le lait mature de femmes ayant eu un diabète gestationnel (61).

Le colostrum contient des protéines et des anticorps, des hormones, des oligosaccharides, des micronutriments et des facteurs de croissance, dont les rôles physiologiques commencent seulement à être élucidés. L'environnement maternel, dont l'alimentation, peut moduler les concentrations de certaines hormones du lait (272). L'altération de ces concentrations pourrait influencer le

développement du nouveau-né, à court et long terme. Ainsi, des études ont corrélé la concentration de certaines hormones du lait, telles que l'insuline et la leptine, à l'IMC maternel (273,274) et au risque de survenue d'un surpoids ou d'une obésité chez le jeune enfant et chez l'adulte (275).

A ce jour, plus d'une vingtaine d'hormones peptidiques ont été répertoriées dans le lait humain, dont l'apeline (274,275). Chez la rate, il a été démontré que l'expression de l'apeline était très marquée dans la glande mammaire, connaissant une nette augmentation au fur et à mesure de l'avancée de la gestation, avec un pic au moment de la naissance (61). Chez le bovin, la concentration en apeline dans le lait est maximale à l'accouchement, puis connaît une décroissance progressive, plus marquée à partir du 10^{ème} jour (61). Ces données ont été confirmées chez la rate (251,276), suggérant l'implication de l'apeline dans le développement de la glande mammaire et la mise en route de la lactation. Cependant, bien que sa production semble endogène au niveau mammaire, le passage de l'apeline circulante maternelle dans le lait reste un mécanisme à éclaircir.

Dans notre étude, la concentration en apeline était augmentée dans le colostrum alors qu'elle était diminuée dans le plasma. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée au transfert de l'apeline dans le colostrum. Il pourrait s'agir soit d'un passage préférentiel de l'apeline du plasma au colostrum, par transport facilité par exemple, soit par une production locale d'apeline par la glande mammaire à ce niveau.

D'autre part, nous avons montré qu'il y avait une augmentation de la concentration en apeline dans le colostrum des femmes obèses en comparaison avec les femmes de poids normal, et une tendance à la diminution des concentrations en cas de diabète gestationnel associé chez les femmes obèses. Ces données sont en accord avec l'étude d'Aydin, *et al.* qui est à ce jour la seule étude dans la littérature s'étant intéressée au colostrum de femmes obèses (IMC > 30 kg/m²). Il retrouvait une diminution du taux d'apeline dans le colostrum en cas de diabète gestationnel (102).

Toutefois, nous restons prudents dans l'interprétation de ces résultats du fait des faibles concentrations en apeline présentes dans le colostrum humain, de l'ordre de 0.06 à 0.2 ng/ml, et de la précision de la technique de dosage par ELISA, dont la sensibilité est de 0.06 ng/ml selon la gamme conseillée par le fournisseur. Cependant, afin de limiter cette imprécision, nous avons réajusté la gamme afin que les concentrations obtenues soient situées au milieu de la nouvelle gamme.

L'augmentation de la concentration en apeline dans le colostrum pourrait permettre de participer à la programmation de la régulation de l'appétit chez le nouveau-né, comme cela a été suggéré pour la leptine (277). En effet, Kuganathan, et al. a montré que chez les femmes obèses, la leptinémie était augmentée, ainsi que la concentration en leptine dans le lait maternel, et que cela induirait une satiété plus rapide chez le nouveau-né, une diminution du poids corporel et de l'adiposité (277). Cette augmentation de la concentration en leptine dans le lait des femmes obèses pourrait permettre de programmer de façon optimale le contrôle de l'appétit de l'enfant.

Il pourrait en être de même pour l'apeline. L'apeline ayant un rôle dans la régulation de la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus, via la production d' α -MSH, et dans le contrôle de l'équilibre glycémique (inhibition de la sécrétion d'insuline, augmentation de la recapture du glucose), l'augmentation de sa concentration dans le colostrum des femmes obèses pourrait avoir comme effet positif de diminuer l'insulinémie du nouveau-né et de participer à la programmation du contrôle de l'appétit et du métabolisme de l'enfant. Chez le rat, il a été montré que l'administration d'apeline augmentait l'absorption du glucose dans le poumon et le muscle fœtal de manière indépendante de l'insuline alors que, à des concentrations plus élevées, cette administration exogène d'apeline était capable de réduire l'insulinémie fœtale et donc d'augmenter la glycémie fœtale (249). Le lait comprend des éléments permettant de réguler le métabolisme énergétique du nouveau-né et de contrôler sa prise alimentaire (278). APJ a été retrouvé dans l'intestin de rats, ce qui laisse supposer que l'apeline puisse exercer un effet à ce niveau (251). Les adipokines joueraient donc un rôle dans la programmation du métabolisme du nouveau-né et dans la régulation de la satiété, via le lait maternel.

Ces effets positifs de ces adipokines via le lait maternel pourrait permettre de contre-balancer la programmation du métabolisme fœtal acquise *in utero* chez les enfants de mère obèse.

CONCLUSION

Dans cette thèse, nous avons montré qu'il y avait une altération du système apelinergique au cours de la gestation chez l'individu obèse.

Ainsi, nous avons mis en évidence que chez la souris obèse et intolérante au glucose soumise à un régime hypercalorique, il y avait une hyperinsulinémie mais ne pas d'hyperapelinémie. Pendant la gestation, il y avait une augmentation de l'apelinémie maternelle à E6.5 et E12.5 puis une diminution à terme (E18.5). Dans le groupe HF, l'apelinémie était augmentée à E18.5 mais pas chez le souriceau. Chez le fœtus à E18.5, l'apelinémie était 6 fois supérieure aux taux maternels.

Chez la femme obèse, il y avait une hyperinsulinémie et une hypoapelinémie au 3^{ème} trimestre de la grossesse. Les règles hygiéno-diététiques suivies par les femmes obèses au cours de la grossesse et leur prise de poids limitée pourraient expliquer les différences observées avec la souris.

L'apelinémie néonatale était corrélée à l'apelinémie maternelle à l'accouchement. Il y avait une augmentation de l'apelinémie dès le 2^{ème} jour du post-partum. La concentration en apeline dans le colostrum de femmes obèses était augmentée en comparaison avec les femmes de poids normal. Cela pourrait permettre au nouveau-né de reprogrammer leur métabolisme afin de diminuer les risques liés à l'obésité de leur mère. L'allaitement maternel, bien que plus difficile dans cette population, serait particulièrement bénéfique pour l'enfant.

L'expression du système apelinergique était augmentée au niveau placentaire (apeline et APJ chez la souris, APJ chez la femme), ce qui laisse supposer une action locale de l'apeline à ce niveau, notamment peut-être sur les contractions utérines. *Ex vivo*, le placenta sécrétait de l'apeline en fin de gestation, chez la souris comme chez la femme. Cette sécrétion diminuait fortement en fin de gestation chez l'individu obèse. L'insuline serait un sécrétagogue de l'apeline au niveau placentaire. La sécrétion d'apeline par les villosités chorales était inhibée par l'angiotensine II, suggérant une régulation fine de la vascularisation placentaire.

Bien qu'il y ait eu plusieurs études humaines sur la modulation du système apelinergique dans les grossesses compliquées ces dernières années, il reste difficile de conclure sur les effets précis de ce système en raison de nombreuses hétérogénéités dans ces études (conception, caractéristiques de la population, techniques de dosage, calendrier de la collecte des échantillons de sang pendant la grossesse, âge gestationnel, critères diagnostiques du DG...). Ainsi, des études expérimentales et

cliniques supplémentaires sont nécessaires pour comprendre toutes les implications de ce système dans différents processus physiologiques clés maternels, placentaires et fœtaux pendant la gestation. L'ensemble des études retrouvées dans la littérature souligne le rôle important de cette voie de signalisation dans le contrôle des fonctions placentaires, du développement du fœtus et de l'angiogenèse.

De manière surprenante, alors que le système d'apelinergique semble être une cible prometteuse pour le diabète et l'obésité, très peu d'études ont visé à évaluer ce système dans le diabète gestationnel et aucune étude n'avait été réalisée sur l'obésité au cours de la grossesse.

L'expression et l'activité placentaire de l'enzyme ACE2 jusqu'à présent ont été proposées pour inactiver l'apeline et donc pour augmenter sa clairance principalement en fin de gestation. Cependant, une étude récente a montré que l'ACE2 clivait [Pyr¹]apeline-13 en [Pyr¹]apeline-13 (1-12) et que ce produit de clivage était biologiquement actif sur APJ dans les tissus cardiovasculaires humains et des rongeurs (279). Ainsi, la clairance accrue de l'apeline en fin de gestation pourrait impliquer une autre voie non caractéristique indépendante de l'ACE2 placentaire.

Enfin, un nouveau ligand peptidique endogène de l'APJ, appelé Elabela / Toddler, a récemment été identifié dans le zébrafish et semble jouer un rôle crucial dans le développement embryonnaire et l'angiogenèse (136,137). Elabela / Toddler pourrait constituer un acteur nouveau dans le système apelinergique pendant la gestation. Sa modulation supposée dans les grossesses compliquées de PE ou de DG nécessite la réalisation de nombreuses recherches supplémentaires.

PERSPECTIVES

Les analyses biologiques prévues dans l'étude OB-APE et non présentées dans cette thèse sont en cours de dosage. Les données sur l'ensemble de la population de l'étude devraient être complètes au cours des prochains mois.

Paramètres métaboliques

Les résultats de l'étude OB-APE vont à l'encontre de ce à quoi nous pouvions nous attendre, à savoir une diminution de l'apelinémie dans les groupes de femmes obèses. Ces résultats pourraient être expliqués par une prise en charge diététique efficace de ces patientes, ou à une activité accrue des enzymes de dégradation de l'apeline. Toutefois, afin de valider notre modèle, nous avons prévu de réaliser des dosages de la leptinémie, gold standard pour l'évaluation du stock énergétique des patientes obèses. Ces analyses sont en cours de réalisation sur l'ensemble des prélèvements de l'étude OB-APE et les résultats devraient être disponibles prochainement.

D'autre part, il existe chez les patientes obèses une lipolyse chronique. Dans notre population, du fait d'une prise de poids limitée et d'une amélioration des paramètres lipidiques, il est probable qu'il y ait une lipolyse majorée. Il a été montré récemment que l'apeline inhibait la lipolyse (106). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que cette lipolyse accrue pourrait en partie expliquer les variations de l'apelinémie dans cette population. S'il y a une lipolyse accrue chez les femmes obèses de notre étude, il devrait se traduire par une augmentation du glycérol et des acides gras libres que nous pourrions doser dans le plasma de ces patientes.

Enfin, pour étudier l'effet de rétrocontrôle des médiateurs de la lipolyse sur le système apelinergique, il serait intéressant de déposer la sécrétion d'apeline in vitro à partir de villosités choriales et de tissu adipeux en culture en présence d'activateurs de la lipolyse.

Système apelinergique : rôle d'ELABELA

Elabela est un nouveau ligand d'APJ, découvert plus récemment que l'apeline. Ce peptide semble être impliqué dans le développement embryonnaire et dans l'angiogénèse. Il pourrait donc avoir un

rôle primordial au cours de la grossesse.

Afin de préciser le rôle du système apelinergique au cours de la gestation, nous envisageons de réaliser des dosages d'Elabela/Toddler sur les différents prélèvements plasmatiques de l'étude OB-APE. Cela permettrait d'évaluer l'implication de ce peptide dans la régulation du métabolisme maternel, son rôle dans les mécanismes périnataux et d'étudier les interactions avec l'apeline.

Apeline : implication au niveau placentaire

Nous avons montré qu'il y avait une augmentation de l'expression de l'apeline de d'APJ au niveau placentaire en fin de gestation, associée à une diminution de la sécrétion chez les femmes enceintes obèses. Cela pourrait s'expliquer soit par une action locale de l'apeline au niveau placentaire (action autocrine ou paracrine), soit par un défaut de synthèse de ce peptide en cas d'obésité.

Dans l'hypothèse où il s'agirait d'une altération des voies de synthèse au niveau placentaire chez les sujets obèses, nous voulons préciser s'il s'agit d'une altération post-traductionnelle, d'une destruction excessive ou d'un défaut de sécrétion. Nous allons donc dans un premier temps doser le contenu protéique en apeline dans les villosités choriales. Du fait de la petite taille du peptide apeline, nous ne pourrions pas réaliser de Western Blot. Nous allons donc utiliser une technique de broyat placentaire afin de réaliser les dosages par ELISA. Cette technique a été développée dans notre laboratoire pour doser la protéine apeline dans les tissus (251), mais elle nécessite des mises au point avant de pouvoir être utilisée pour réaliser des dosages dans le placenta. Dans un second temps, nous analyserons les voies de dégradation de l'apeline. Nous allons donc doser les activités d'ACE 2 et de PRCP, 2 enzymes connues responsables de la dégradation de l'apeline. Yamaleyeva, *et al.* a mis en évidence une augmentation de l'activité de l'ACE2 dans le placenta de femmes prééclampsiques en fin de grossesse (146). Si leur activité placentaire est augmentée, cela pourrait expliquer, du moins en partie, la diminution de l'apelinémie chez les femmes enceintes obèses.

D'autre part, nous avons montré que les taux d'apeline plasmatique maternel et néonatal étaient corrélés à la naissance, et Malamitsi-Puchner, *et al.* avait montré une diminution rapide des taux du nouveau-né après la naissance (97). L'apeline étant une molécule de très petite taille, elle pourrait passer la barrière foëto-placentaire. Pour étudier la capacité d'étudier le passage trans-placentaire

dans ce peptide, nous envisageons de collaborer avec le Pr Sophie Gil qui utilise un modèle de « placenta perfusé ».

Enfin, il a été montré que la localisation placentaire de l'apeline et d'APJ était modulée au cours de la grossesse (155). Elle pourrait donc également être modulée en cas de pathologie, et notamment en cas d'obésité, associée ou non à un diabète gestationnel. Afin d'étudier cela, nous allons réaliser de l'immunohistochimie pour vérifier la localisation d'apeline et d'APJ au sein des villosités choriales en cas d'obésité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ObEpi-Roche. ObEpi-Roche 2012 : enquête nationale sur l'obésité et le surpoids. 2012.
2. Castetbon K, Vernay M, Deschamps V, Salanave B, Malon A, Hercberg S. Situation nutritionnelle en France selon les indicateurs d'objectif et les repères du Programme national nutrition santé (PNNS). Étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006): prévalences de l'obésité, de l'hypertension artérielle et des dyslipidémies. *Obésité*. 2008;3(1):19- 26.
3. BEH n°35-36/2016 / 2016 / Archives / BEH - Bulletin épidémiologique hebdomadaire / Publications et outils / Accueil. Disponible sur: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/BEH-Bulletin-epidemiologique-hebdomadaire/Archives/2016/BEH-n-35-36-2016>
4. Ciangura C, Poitou-Bernert C. Complications des obésités. *EMC - Endocrinol - Nutr*. janv 2011;8(1):1- 12.
5. Ruegsegger GN, Booth FW. Running from Disease: Molecular Mechanisms Associating Dopamine and Leptin Signaling in the Brain with Physical Inactivity, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol*. 2017;8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC5440472/>
6. Phelan S. Pregnancy: a « teachable moment » for weight control and obesity prevention. *Am J Obstet Gynecol*. févr 2010;202(2):135.e1-8.
7. Chang T, Moniz MH, Plegue MA, Sen A, Davis MM, Villamor E, et al. Characteristics of women age 15-24 at risk for excess weight gain during pregnancy. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173790.
8. Heude B, Thiébauges O, Goua V, Forhan A, Kaminski M, Foliguet B, et al. Pre-pregnancy body mass index and weight gain during pregnancy: relations with gestational diabetes and hypertension, and birth outcomes. *Matern Child Health J*. févr 2012;16(2):355- 63.

9. Siega-Riz AM, Viswanathan M, Moos M-K, Deierlein A, Mumford S, Knaack J, et al. A systematic review of outcomes of maternal weight gain according to the Institute of Medicine recommendations: birthweight, fetal growth, and postpartum weight retention. *Am J Obstet Gynecol.* oct 2009;201(4):339.e1-14.
10. Davis EM, Zyzanski SJ, Olson CM, Stange KC, Horwitz RI. Racial, ethnic, and socioeconomic differences in the incidence of obesity related to childbirth. *Am J Public Health.* févr 2009;99(2):294- 9.
11. Poston L. Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* oct 2012;26(5):627- 39.
12. Deruelle P. Obesity and pregnancy. *Gynecol Obstet Fertil.* févr 2011;39(2):100- 5.
13. Stothard KJ, Tennant PWG, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA J Am Med Assoc.* 11 févr 2009;301(6):636- 50.
14. Buschur E, Kim C. Guidelines and interventions for obesity during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet.* oct 2012;119(1):6- 10.
15. Barker, et al. DJP. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr.* déc 2004;23(6 Suppl):588S- 595S.
16. Masuyama H, Hiramatsu Y. Effects of a High-Fat Diet Exposure in Utero on the Metabolic Syndrome-Like Phenomenon in Mouse Offspring through Epigenetic Changes in Adipocytokine Gene Expression. *Endocrinology.* 6 janv 2012;153(6):2823- 30.
17. Samuelsson A-M, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EHJM, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension.* févr 2008;51(2):383- 92.
18. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass

index. *Nat Genet.* nov 2010;42(11):937- 48.

19. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 11 mai 2007;316(5826):889- 94.

20. Soderborg TK, Borengasser SJ, Barbour LA, Friedman JE. Microbial transmission from mothers with obesity or diabetes to infants: an innovative opportunity to interrupt a vicious cycle. *Diabetologia.* mai 2016;59(5):895- 906.

21. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2004;89(6):2548- 56.

22. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Dig Dis Sci.* 1 sept 2009;54(9):1847- 56.

23. Paniagua JA. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes.* 15 nov 2016;7(19):483.

24. Wojcik B, Gorski J. Brown adipose tissue in adult humans : distribution and function. *Endocrinol Obes Metab Disord.* 7(1):34- 40.

25. Kuryszko J, Sławuta P, Sapikowski G. Secretory function of adipose tissue. *Pol J Vet Sci.* 2016;19(2):441- 6.

26. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes.* déc 2004;28 Suppl 4:S12-21.

27. Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon B. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 30 mai 2005;1740(2):293- 304.

28. Azais H, Leroy A, Ghesquiere L, Deruelle P, Hanssens S. Effects of adipokines and

obesity on uterine contractility. *Cytokine Growth Factor Rev.* avr 2017;34:59- 66.

29. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 15 oct 2015;309(8):E691- 714.

30. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest.* 1 mars 1996;97(5):1344- 7.

31. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and Hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1 sept 2016;45(3):633- 45.

32. Hukshorn CJ, Saris WHM. Leptin and energy expenditure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* nov 2004;7(6):629- 33.

33. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem.* sept 2004;50(9):1511- 25.

34. Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G, Martin LJ, Jacob HJ, Black AE, et al. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndr

	GDM (<i>n</i> = 30)	Control (<i>n</i> = 30)	<i>P</i>
Age (year)	30.9 ± 4.2	31.0 ± 3.2	0.945
BMI (kg/m ²)	25.9 ± 3.3	25.7 ± 2.8	0.887
Fasting glucose (mg/dl)	90.7 ± 17.0	93.1 ± 6.9	0.477
Fasting insulin (μIU/ml)	24.5 ± 15.8	12.2 ± 6.6	<0.001*
1-h glucose ^a (mg/dl)	165.1 ± 28.0	104.3 ± 22.1	<0.001*
HOMA-IR	8.5 ± 12.2	3.7 ± 1.5	0.001*
Cord blood glucose (mg/dl)	85.8 ± 16.7	84.7 ± 15.5	0.792
Cord blood insulin (μIU/ml)	24.5 ± 15.8	8.5 ± 0.8	0.114
Gestational age (week)	37.2 ± 2.4	36.7 ± 2.6	0.469
Birth weight (g)	3002.8 ± 641.7	2653.2 ± 638.8	0.039*
Apgar 1 min	8.2 ± 0.6	8.2 ± 0.9	0.863
Apgar 5 min	8.4 ± 0.9	8.4 ± 2.3	0.941
Cesarean section rate, <i>n</i> (%)	7/30 (23.3%)	3/30 (10%)	0.299
Maternal serum apelin-36 (ng/ml)	13.5 ± 8.3	9.6 ± 5.9	0.001*
Maternal serum nesfatin-1 (ng/ml)	5.5 ± 8.1	8.1 ± 23.9	0.001*
Cord blood apelin-36 (ng/ml)	8.8 ± 4.3	8.2 ± 1.9	0.618
Cord blood nesfatin-1 (ng/ml)	5.4 ± 4.0	6.2 ± 10.3	0.688

ome. J Clin Endocrinol Metab. sept 2001;86(9):4321- 5.

35. Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab. sept 2002;34(9):469- 74.

36. Lafontan M, Viguerie N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. Curr Opin Pharmacol. déc 2006;6(6):580- 5.

37. Mouraux T. Le tissu adipeux : un bout de gras se découvre intelligent. Percentile. automne 2007; Disponible sur: <http://www.huderf.be/fr/edu/diabeto/pdf/perc-adipeux.pdf>

38. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature. 18 janv 2001;409(6818):307- 12.

39. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin Is an Inflammatory Marker of Atherosclerosis in Humans. Circulation. 22 févr 2005;111(7):932- 9.

40. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on

chromosome 11. *Gene*. 22 déc 1993;136(1- 2):355- 60.

41. Castan-Laurell I, Dray C, Attané C, Duparc T, Knauf C, Valet P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*. août 2011;40(1):1- 9.

42. Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF. The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq Bras Cardiol*. mai 2008;90(5):343- 9.

43. Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll A-M. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides*. janv 2012;33(1):139- 48.

44. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal*. avr 2005;17(4):415- 26.

45. D'Aniello C, Lonardo E, Iaconis S, Guardiola O, Liguoro AM, Liguori GL, et al. G protein-coupled receptor APJ and its ligand apelin act downstream of Cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated kinase/p70S6 kinase signaling pathway. *Circ Res*. 31 juill 2009;105(3):231- 8.

46. Butruille L, Drougard A, Knauf C, Moitrot E, Valet P, Storme L, et al. The apelinergic system: Sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice. *Peptides*. 2013; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978113002040>

47. O'Carroll A-M, Lolait SJ, Harris LE, Pope GR. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J Endocrinol*. oct 2013;219(1):R13-35.

48. Boucher, et al. et al. Apelin, a Newly Identified Adipokine Up-Regulated by Insulin and Obesity. 2005. Disponible sur: <http://endo.endojournals.org/content/146/4/1764.full.pdf+html>

49. Zhou N, Zhang X, Fan X, Argyris E, Fang J, Acheampong E, et al. The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology*. 5 déc 2003;317(1):84- 94.

50. Lee DK, Ferguson SSG, George SR, O'Dowd BF. The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 avr 2010;395(2):185- 9.
51. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buléon M, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* nov 2008;8(5):437- 45.
52. Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, et al. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* janv 2010;298(1):E59-67.
53. Zhong J-C, Yu X-Y, Huang Y, Yung L-M, Lau C-W, Lin S-G. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res.* 1 juin 2007;74(3):388- 95.
54. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem.* 18 juin 2004;279(25):26274- 9.
55. Xu S, Han P, Huang M, Wu JC, Chang C, Tsao PS, et al. In vivo, ex vivo, and in vitro studies on apelin's effect on myocardial glucose uptake. *Peptides.* oct 2012;37(2):320- 6.
56. Dray C, Foussal C, Attané C, Kunduzova O, Daviaud D, Valet P, et al. L'apeline: de la fonction cardiaque au métabolisme énergétique. *Sang Thrombose Vaisseaux* 21 n°7. 2009;
57. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 1 nov 2004;117(Pt 23):5479- 87.
58. Tatemoto K. Search for an endogenous ligand of the orphan G protein-coupled receptor--discovery of apelin, a novel biologically active peptide. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med.* mars 2000;58(3):737- 46.
59. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem.* janv 2000;74(1):34- 41.
60. Carpéné C, Dray C, Attané C, Valet P, Portillo MP, Churruca I, et al. Expanding role for

the apelin/APJ system in physiopathology. *J Physiol Biochem.* déc 2007;63(4):359- 73.

61. Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta.* 13 oct 1999;1452(1):25- 35.

62. Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther.* août 2005;107(2):198- 211.

63. Pitkin SL, Maguire JJ, Bonner TI, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev.* sept 2010;62(3):331- 42.

64. Yang P, Maguire JJ, Davenport AP. Apelin, Elabela/Toddler, and biased agonists as novel therapeutic agents in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci.* sept 2015;36(9):560- 7.

65. O'Shea M, Hansen MJ, Tatemoto K, Morris MJ. Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci.* 2003;(353):1- 4.

66. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem.* 14 juill 2000;275(28):21061- 7.

67. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept.* 15 juin 2001;99(2- 3):87- 92.

68. El Messari S, Iturrioz X, Fassot C, De Mota N, Roesch D, Llorens-Cortes C. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J Neurochem.* sept 2004;90(6):1290- 301.

69. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 juill

2004;101(28):10464- 9.

70. Azizi M, Iturrioz X, Blanchard A, Peyrard S, De Mota N, Chartrel N, et al. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J Am Soc Nephrol JASN*. mai 2008;19(5):1015- 24.

71. Llorens-Cortes C, Beaudet A. Apelin, a neuropeptide that counteracts vasopressin secretion. *Med Sci Paris*. 2005;(21):741- 6.

72. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 26 avr 2002;277(17):14838- 43.

73. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 1 sept 2000;87(5):E1-9.

74. Boehm M, Nabel EG. Angiotensin-converting enzyme 2--a new cardiac regulator. *N Engl J Med*. 28 nov 2002;347(22):1795- 7.

75. Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, OCarroll A-M, Mochizuki T, et al. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology*. mars 2004;145(3):1342- 8.

76. Kourtis, et al. Apelin levels in normal pregnancy - Kourtis - 2011 - *Clinical Endocrinology* - Wiley Online Library. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doc-distant.univ-lille2.fr/doi/10.1111/j.1365-2265.2011.04061.x/pdf>

77. Cheng X, Cheng XS, Pang CCY. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol*. 6 juin 2003;470(3):171- 5.

78. Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene*. 6 déc 2007;26(55):7692- 9.

79. Maguire JJ, Kleinz MJ, Pitkin SL, Davenport AP. [Pyr1]apelin-13 identified as the

predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertens Dallas Tex* 1979. sept 2009;54(3):598- 604.

80. Castan-Laurell I, Boucher J, Dray C, Daviaud D, Guigné C, Valet P. Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: Friend or foe? *Mol Cell Endocrinol*. décembre 2005;245(1-2):7- 9.

81. Rayalam S, Della-Fera MA, Krieg PA, Cox CM, Robins A, Baile CA. A putative role for apelin in the etiology of obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. avril 2008;368(3):815- 9.

82. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, et al. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem*. mai 2001;77(4):1085- 96.

83. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem*. mars 2003;84(5):1162- 72.

84. Stockand JD. Vasopressin regulation of renal sodium excretion. *Kidney Int*. nov 2010;78(9):849- 56.

85. Falcão-Pires I, Ladeiras-Lopes R, Leite-Moreira AF. The apelinergic system: a promising therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. juin 2010;14(6):633- 45.

86. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett*. 15 déc 2003;353(1):1- 4.

87. Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, et al. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic α -MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. nov 2011;301(5):E955-966.

88. Devic E, Paquereau L, Vernier P, Knibiehler B, Audigier Y. Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*. oct 1996;59(2):129- 40.

89. Japp AG, Newby DE. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic

relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol.* 15 mai 2008;75(10):1882- 92.

90. Andersen CU, Hilberg O, Mellekjær S, Nielsen-Kudsk JE, Simonsen U. Apelin and pulmonary hypertension. *Pulm Circ.* sept 2011;1(3):334- 46.

91. Zhong J-C, Huang Y, Yung L-M, Lau C-W, Leung F-P, Wong W-T, et al. The novel peptide apelin regulates intrarenal artery tone in diabetic mice. *Regul Pept.* 4 déc 2007;144(1- 3):109- 14.

92. Siddiquee K, Hampton J, McAnally D, May L, Smith L. The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br J Pharmacol.* mars 2013;168(5):1104- 17.

93. Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res.* 6 sept 2002;91(5):434- 40.

94. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* juin 2006;8(4):355- 60.

95. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 déc 2004;325(2):395- 400.

96. Cleaver O, Tonissen KF, Saha MS, Krieg PA. Neovascularization of the *Xenopus* embryo. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* sept 1997;210(1):66- 77.

97. Malamitsi-Puchner A, Gourgiotis D, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, Briana DD. Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. déc 2007;96(12):1751- 4.

98. Sörhede Winzell M, Magnusson C, Ahrén B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept.* nov 2005;131(1- 3):12- 7.

99. Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, et al. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal*. 15 sept 2011;15(6):1477- 96.
100. Dray C, Sakar Y, Vinel C, Daviaud D, Masri B, Garrigues L, et al. The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology*. avr 2013;144(4):771- 80.
101. Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab TEM*. mai 2012;23(5):234- 41.
102. Mayeur S, Watzet J-S, Lukaszewski M-A, Lecoutre S, Butruille L, Drougard A, et al. Apelin Controls Fetal and Neonatal Glucose Homeostasis and Is Altered by Maternal Undernutrition. *Diabetes*. mars 2016;65(3):554- 60.
103. Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, et al. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*. juin 2007;148(6):2690- 7.
104. Hu H, He L, Li L, Chen L. Apelin/APJ system as a therapeutic target in diabetes and its complications. *Mol Genet Metab*. sept 2016;119(1- 2):20- 7.
105. Yamamoto T, Habata Y, Matsumoto Y, Yasuhara Y, Hashimoto T, Hamajyo H, et al. Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 1 sept 2011;1810(9):853- 62.
106. Than A, Cheng Y, Foh L-C, Leow MK-S, Lim SC, Chuah YJ, et al. Apelin inhibits adipogenesis and lipolysis through distinct molecular pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 15 oct 2012;362(1-2):227- 41.
107. Yue P, Jin H, Xu S, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, et al. Apelin Decreases Lipolysis via Gq, Gi, and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology*. 1 janv 2011;152(1):59- 68.
108. Meek SE, Nair KS, Jensen MD. Insulin regulation of regional free fatty acid

metabolism. *Diabetes*. 1 janv 1999;48(1):10- 4.

109. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, et al. TNF α up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J*. 7 janv 2006;20(9):1528- 30.

110. Castan-Laurell I, Vítkova M, Daviaud D, Dray C, Kováčiková M, Kovacova Z, et al. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. juin 2008;158(6):905- 10.

111. Ehrenberg HM, Durnwald CP, Catalano P, Mercer BM. The influence of obesity and diabetes on the risk of cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol*. sept 2004;191(3):969- 74.

112. Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*. févr 2004;103(2):219- 24.

113. Weiss JL, Malone FD, Emig D, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, et al. Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol*. avr 2004;190(4):1091- 7.

114. Barau G, Robillard P-Y, Hulsey TC, Dedecker F, Laffite A, Gérardin P, et al. Linear association between maternal pre-pregnancy body mass index and risk of caesarean section in term deliveries. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. oct 2006;113(10):1173- 7.

115. Chu SY, Kim SY, Schmid CH, Dietz PM, Callaghan WM, Lau J, et al. Maternal obesity and risk of cesarean delivery: a meta-analysis. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. sept 2007;8(5):385- 94.

116. Denison FC, Price J, Graham C, Wild S, Liston WA. Maternal obesity, length of gestation, risk of postdates pregnancy and spontaneous onset of labour at term. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. mai 2008;115(6):720- 5.

117. Zhang J, Bricker L, Wray S, Quenby S. Poor uterine contractility in obese women. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. mars 2007;114(3):343- 8.

118. Arrowsmith S, Wray S, Quenby S. Maternal obesity and labour complications following induction of labour in prolonged pregnancy. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. avr

2011;118(5):578- 88.

119. Ovesen P, Rasmussen S, Kesmodel U. Effect of prepregnancy maternal overweight and obesity on pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* août 2011;118(2 Pt 1):305- 12.

120. Frey HA, Tuuli MG, England SK, Roehl KA, Odibo AO, Macones GA, et al. Factors associated with higher oxytocin requirements in labor. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* sept 2015;28(13):1614- 9.

121. Pevzner L, Powers BL, Rayburn WF, Rumney P, Wing DA. Effects of maternal obesity on duration and outcomes of prostaglandin cervical ripening and labor induction. *Obstet Gynecol.* déc 2009;114(6):1315- 21.

122. Barrichon M, Hadi T, Wendremaire M, Ptasinski C, Seigneuric R, Marcion G, et al. Dose-dependent biphasic leptin-induced proliferation is caused by non-specific IL-6/NF- κ B pathway activation in human myometrial cells. *Br J Pharmacol.* juin 2015;172(12):2974- 90.

123. Carlson NS, Hernandez TL, Hurt KJ. Parturition dysfunction in obesity: time to target the pathobiology. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 18 déc 2015;13:135.

124. Lowe NK, Corwin EJ. Proposed biological linkages between obesity, stress, and inefficient uterine contractility during labor in humans. *Med Hypotheses.* mai 2011;76(5):755- 60.

125. Moynihan AT, Hehir MP, Glavey SV, Smith TJ, Morrison JJ. Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* août 2006;195(2):504- 9.

126. Hehir MP, Glavey SV, Morrison JJ. Uterorelaxant effect of ghrelin on human myometrial contractility. *Am J Obstet Gynecol.* mars 2008;198(3):323.e1-5.

127. Vickers MH. Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. *World J Diabetes.* 15 sept 2011;2(9):137- 48.

128. Butruille L. Altération de la croissance foetale et programmation métabolique : étude de l'implication des RHO-kinases et du système apelinergique chez les rongeurs. Thèse;

2013.

129. Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Pääkkönen M, Pirinen E, Alhava E, et al. Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul Pept.* 15 août 2005;130(1- 2):7- 13.

130. Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang M, Yang H, et al. Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* nov 2006;114(10):544- 8.

131. Heinonen MV, Laaksonen DE, Karhu T, Karhunen L, Laitinen T, Kainulainen S, et al. Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD.* nov 2009;19(9):626- 33.

132. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, et al. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg.* nov 2009;19(11):1574- 80.

133. Reinehr T, Woelfle J, Roth CL. Lack of association between apelin, insulin resistance, cardiovascular risk factors, and obesity in children: a longitudinal analysis. *Metabolism.* sept 2011;60(9):1349- 54.

134. Ren F. Y, Shen C, Li X, Ren G, Fan X, Ren F, et al. Low plasma apelin in newly diagnosed type 2 diabetes in Chinese people. *Diabetes Care.* déc 2009;32(12):e150.

135. Erdem G, Dogru T, Tasci I, Sonmez A, Tapan S. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* mai 2008;116(5):289- 92.

136. Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B. ELABELA: A Hormone Essential for Heart Development Signals via the Apelin Receptor. *Dev Cell.* 23 déc 2013;27(6):672- 80.

137. Pauli A, Norris ML, Valen E, Chew G-L, Gagnon JA, Zimmerman S, et al. Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science.* 14 févr

2014;343(6172):1248636.

138. Wang Z, Yu D, Wang M, Wang Q, Kouznetsova J, Yang R, et al. Elabela-Apelin Receptor Signaling Pathway is Functional in Mammalian Systems. *Sci Rep.* 2 févr 2015;5:srep08170.

139. Sato T, Sato C, Kadowaki A, Watanabe H, Ho L, Ishida J, et al. ELABELA-APJ axis protects from pressure overload heart failure and angiotensin II-induced cardiac damage. *Cardiovasc Res.* 1 juin 2017;113(7):760- 9.

140. Charo DN, Ho M, Fajardo G, Kawana M, Kundu RK, Sheikh AY, et al. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* nov 2009;297(5):H1904-1913.

141. Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, et al. Impaired Heart Contractility in Apelin Gene-Deficient Mice Associated With Aging and Pressure Overload. *Circ Res.* 17 août 2007;101(4):e32- 42.

142. Kang Y, Kim J, Anderson JP, Wu J, Gleim SR, Kundu RK, et al. Apelin-APJ Signaling Is a Critical Regulator of Endothelial MEF2 Activation in Cardiovascular Development. *Circ Res.* 21 juin 2013;113(1):22- 31.

143. Roberts EM, Newson MJF, Pope GR, Landgraf R, Lolait SJ, O'Carroll A-M. Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice. *J Endocrinol.* 9 janv 2009;202(3):453- 62.

144. Valsamakis G, Kumar S, Creatsas G, Mastorakos G. The effects of adipose tissue and adipocytokines in human pregnancy. *Ann N Y Acad Sci.* sept 2010;1205:76- 81.

145. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care.* juill 2007;30 Suppl 2:S112-119.

146. Yamaleyeva LM, Chappell MC, Brosnihan KB, Anton L, Caudell DL, Shi S, et al. Downregulation of apelin in the human placental chorionic villi from preeclamptic

pregnancies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 15 nov 2015;309(10):E852-860.

147. Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta.* 13 oct 1999;1452(1):25- 35.

148. Lim R, Barker G, Riley C, Lappas M. Apelin is decreased with human preterm and term labor and regulates prolabor mediators in human primary amnion cells. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* août 2013;20(8):957- 67.

149. Telejko B, Kuzmicki M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Szamatowicz J, Nikolajuk A, Zonenberg A, et al. Plasma apelin levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* févr 2010;87(2):176- 83.

150. Van Mieghem T, van Bree R, Van Herck E, Pijnenborg R, Deprest J, Verhaeghe J. Maternal apelin physiology during rat pregnancy: the role of the placenta. *Placenta.* août 2010;31(8):725- 30.

151. Wang W, McKinnie SMK, Farhan M, Paul M, McDonald T, McLean B, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertens Dallas Tex* 1979. août 2016;68(2):365- 77.

152. Van Mieghem T, Doherty A, Baczyk D, Drewlo S, Baud D, Carvalho J, et al. Apelin in Normal Pregnancy and Pregnancies Complicated by Placental Insufficiency. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* août 2016;23(8):1037- 43.

153. Hanssens S, Marx-Deseure A, Lecoutre S, Butruille L, Fournel A, Knauf C, et al. Maternal obesity alters the apelinergic system at the feto-maternal interface. *Placenta.* mars 2016;39:41- 4.

154. Bortoff KD, Qiu C, Runyon S, Williams MA, Maitra R. Decreased maternal plasma apelin concentrations in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2012;31(4):398- 404.

155. Cobellis L, De Falco M, Mastrogiacomo A, Giraldi D, Dattilo D, Scaffa C, et al.

Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Histol Histopathol.* 2007;22(1):1- 8.

156. Elaine N Marieb. *Biologie Humaine, Principes d'anatomie et de physiologie.* In: éd 8ème édition. 2008.

157. Liao Y-M, Qiao F-Y. Expression of Apelin in placentas of patients with hypertensive disorders complicating pregnancy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* juin 2007;42(6):382 - 5.

158. Ho L, Tan SYX, Wee S, Wu Y, Tan SJC, Ramakrishna NB, et al. ELABELA Is an Endogenous Growth Factor that Sustains hESC Self-Renewal via the PI3K/AKT Pathway. *Cell Stem Cell.* 1 oct 2015;17(4):435- 47.

159. Helker CS, Schuermann A, Pollmann C, Chng SC, Kiefer F, Reversade B, et al. The hormonal peptide Elabela guides angioblasts to the midline during vasculogenesis. *eLife* [Internet]. 2015 [cité 16 juill 2017];4. Disponible sur: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC4468421/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC4468421/)

160. Kehoe K, Van Elzen R, Verkerk R, Sim Y, Van der Veken P, Lambeir A-M, et al. Prolyl carboxypeptidase purified from human placenta: its characterization and identification as an apelin-cleaving enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1864(11):1481 - 8.

161. Sun X, Iida S, Yoshikawa A, Senbonmatsu R, Imanaka K, Maruyama K, et al. Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* juin 2011;34(6):701 - 6.

162. Menon R, Bonney EA, Condon J, Mesiano S, Taylor RN. Novel concepts on pregnancy clocks and alarms: redundancy and synergy in human parturition. *Hum Reprod Update.* sept 2016;22(5):535 - 60.

163. Zeng X-XI, Wilm TP, Sepich DS, Solnica-Krezel L. Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation. *Dev Cell.* mars 2007;12(3):391 - 402.

164. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for

normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol.* 1 août 2006;296(1):177- 89.

165. Piai P, Moura RS, Nogueira-Silva C, Correia-Pinto J. The apelinergic system in the developing lung: expression and signaling. *Peptides.* déc 2011;32(12):2474- 83.

166. Dessì A, Pravettoni C, Cesare Marincola F, Schirru A, Fanos V. The biomarkers of fetal growth in intrauterine growth retardation and large for gestational age cases: from adipocytokines to a metabolomic all-in-one tool. *Expert Rev Proteomics.* juin 2015;12(3):309- 16.

167. Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, et al. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol.* avr 2004;181(1):11- 23.

168. Gicquel C, Le Bouc Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res.* 2006;65 Suppl 3:28- 33.

169. Smerieri A, Petraroli M, Ziveri MA, Volta C, Bernasconi S, Street ME. Effects of cord serum insulin, IGF-II, IGFBP-2, IL-6 and cortisol concentrations on human birth weight and length: pilot study. *PloS One.* 2011;6(12):e29562.

170. Frias AE, Grove KL. Obesity: a transgenerational problem linked to nutrition during pregnancy. *Semin Reprod Med.* déc 2012;30(6):472- 8.

171. Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics.* févr 2010;125(2):e214-224.

172. Yu Z, Han S, Zhu J, Sun X, Ji C, Guo X. Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2013;8(4):e61627.

173. Gardosi J, Chang A, Kalyan B, Sahota D, Symonds EM. Customised antenatal growth charts. *Lancet Lond Engl.* 1 févr 1992;339(8788):283- 7.

174. Ego A, Subtil D, Grange G, Thiebaugeorges O, Senat M-V, Vayssiere C, et al. Customized versus population-based birth weight standards for identifying growth restricted

infants: a French multicenter study. *Am J Obstet Gynecol.* avr 2006;194(4):1042 - 9.

175. Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy.* 2012;2012:179827.

176. Furuya M, Okuda M, Usui H, Takenouchi T, Kami D, Nozawa A, et al. Expression of angiotensin II receptor-like 1 in the placentas of pregnancy-induced hypertension. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol.* mai 2012;31(3):227 - 35.

177. Aslan M, Celik O, Celik N, Turkcuoglu I, Yilmaz E, Karaer A, et al. Cord blood nesfatin-1 and apelin-36 levels in gestational diabetes mellitus. *Endocrine.* juin 2012;41(3):424 - 9.

178. Inuzuka H, Nishizawa H, Inagaki A, Suzuki M, Ota S, Miyamura H, et al. Decreased expression of apelin in placentas from severe pre-eclampsia patients. *Hypertens Pregnancy.* nov 2013;32(4):410 - 21.

179. Oncul M, Tuten A, Erman H, Gelisgen R, Benian A, Uzun H. Maternal and cord blood apelin, resistin and visfatin levels in gestational diabetes mellitus. *Minerva Med.* oct 2013;104(5):527 - 35.

180. Briana DD, Boutsikou M, Boutsikou T, Malamitsi-Puchner A. Associations of novel adipocytokines with bone biomarkers in intra uterine growth-restricted fetuses/neonates at term. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* juill 2014;27(10):984 - 8.

181. Lim R, Barker G, Riley C, Lappas M. Apelin is decreased with human preterm and term labor and regulates prolabor mediators in human primary amnion cells. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* août 2013;20(8):957 - 67.

182. Cekmez F, Pirgon O, Aydemir G, Dundar B, Cekmez Y, Karaoglu A, et al. Correlation between cord blood apelin and IGF-1 levels in retinopathy of prematurity. *Biomark Med.* déc 2012;6(6):821 - 5.

183. Ghesquière L, Azaïs H, Leroy A, Petit C, Deruelle P, Hanssens S. Intérêt du sport pendant la grossesse chez la femme enceinte obèse : le rôle-clé des adipokines. *Sci Sport.*

2017;under submission.

184. Hehir MP, Morrison JJ. The adipokine apelin and human uterine contractility. *Am J Obstet Gynecol.* avr 2012;206(4):359.e1-359.e5.

185. Japp AG, Cruden NL, Amer DAB, Li VKY, Goudie EB, Johnston NR, et al. Vascular Effects of Apelin In Vivo in Man. *J Am Coll Cardiol.* 9 sept 2008;52(11):908- 13.

186. Lim R, Barker G, Riley C, Lappas M. Apelin is decreased with human preterm and term labor and regulates prolabor mediators in human primary amnion cells. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* août 2013;20(8):957- 67.

187. Telejko B, Kuzmicki M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Szamatowicz J, Nikolajuk A, Zonenberg A, et al. Plasma apelin levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* févr 2010;87(2):176- 83.

188. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet Lond Engl.* 30 janv 2016;387(10017):475- 90.

189. Savino F, Benetti S, Liguori SA, Sorrenti M, Cordero Di Montezemolo L. Advances on human milk hormones and protection against obesity. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr.* 3 nov 2013;59(1):89- 98.

190. Al Mamun A, O'Callaghan MJ, Williams GM, Najman JM, Callaway L, McIntyre HD. Breastfeeding is protective to diabetes risk in young adults: a longitudinal study. *Acta Diabetol.* oct 2015;52(5):837- 44.

191. Drozdowski LA, Clandinin T, Thomson ABR. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J Gastroenterol.* 21 févr 2010;16(7):787- 99.

192. Cummins AG, Thompson FM. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut.* nov 2002;51(5):748- 54.

193. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Impact of human milk bacteria and

oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev.* juill 2015;73(7):426- 37.

194. Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab.* déc 1997;82(12):4270- 3.

195. Picó C, Sánchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Palou A. Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the post-natal period. *Genes Nutr.* oct 2007;2(1):139- 41.

196. Lostao MP, Urdaneta E, Martínez-Ansó E, Barber A, Martínez JA. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett.* 27 févr 1998;423(3):302- 6.

197. Grönberg M, Amini R-M, Stridsberg M, Janson ET, Saras J. Neuroendocrine markers are expressed in human mammary glands. *Regul Pept.* 25 févr 2010;160(1- 3):68- 74.

198. Wang Z, Greeley GH Jr, Qiu S. Immunohistochemical localization of apelin in human normal breast and breast carcinoma. *J Mol Histol.* févr 2008;39(1):121- 4.

199. Aydin et al. S. The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides.* déc 2010;31(12):2236- 40.

200. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 20 oct 1998;251(2):471- 6.

201. Fournel A, Drougard A, Duparc T, Marlin A, Brierley SM, Castro J, et al. Apelin targets gut contraction to control glucose metabolism via the brain. *Gut.* févr 2017;66(2):258- 69.

202. Wang G, Kundu R, Han S, Qi X, Englander EW, Quertermous T, et al. Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul Pept.* 27 nov 2009;158(1- 3):32- 9.

203. Buonfiglio DC, Ramos-Lobo AM, Freitas VM, Zampieri TT, Nagaishi VS, Magalhães M, et al. Obesity impairs lactation performance in mice by inducing prolactin resistance. *Sci Rep* [Internet]. 2016 [cité 12 juill 2017];6. Disponible sur: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC4772384/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC4772384/)
204. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics*. mai 2005;115(5):1367- 77.
205. Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G, Plagemann A. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 1 sept 2005;162(5):397- 403.
206. Mayer-Davis EJ, Rifas-Shiman SL, Zhou L, Hu FB, Colditz GA, Gillman MW. Breast-Feeding and Risk for Childhood Obesity: Does maternal diabetes or obesity status matter? *Diabetes Care*. oct 2006;29(10):2231.
207. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet Lond Engl*. 26 mars 2005;365(9461):785- 99.
208. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim K-H, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 12 févr 2004;350(7):672- 83.
209. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. juill 2003;69(1):1- 7.
210. Rockwell LC, Vargas E, Moore LG. Human physiological adaptation to pregnancy: inter- and intraspecific perspectives. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Council*. juin 2003;15(3):330- 41.
211. Ivars J, Butruille L, Knauf C, Bouckennooghe T, Mayeur S, Vieau D, et al. Maternal hypertension induces tissue-specific modulations of the apelinergic system in the fetoplacental unit in rat. *Peptides*. mai 2012;35(1):136- 8.
212. Kucur M, Tuten A, Oncul M, Acikgoz AS, Yuksel MA, Imamoglu M, et al. Maternal

serum apelin and YKL-40 levels in early and late-onset pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy*. nov 2014;33(4):467- 75.

213. Simsek Y, Celik O, Yilmaz E, Karaer A, Dogan C, Aydin S, et al. Serum levels of apelin, salusin-alpha and salusin-beta in normal pregnancy and preeclampsia. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. sept 2012;25(9):1705- 8.

214. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kato T, Kowa H, Kurahashi H, Udagawa Y. Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placental tissue derived from early and late onset severe pre-eclampsia. *Placenta*. juin 2007;28(5- 6):487- 97.

215. Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Kurahashi H, et al. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2 août 2011;9:107.

216. Landon MB, Gabbe SG. Gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol*. déc 2011;118(6):1379- 93.

217. Senat M-V, Deruelle P. [Gestational diabetes mellitus]. *Gynecol Obstet Fertil*. avr 2016;44(4):244- 7.

218. Schmidt MI, Duncan BB, Reichelt AJ, Branchtein L, Matos MC, Costa e Forti A, et al. Gestational diabetes mellitus diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes Care*. juill 2001;24(7):1151- 5.

219. Gilmartin ABH, Ural SH, Repke JT. Gestational diabetes mellitus. *Rev Obstet Gynecol*. 2008;1(3):129- 34.

220. Fasshauer M, Blüher M, Stumvoll M. Adipokines in gestational diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. juin 2014;2(6):488- 99.

221. Petry CJ. Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment. *Br J Nutr*. sept 2010;104(6):775- 87.

222. Chaves-Almagro C, Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Valet P, Masri B. Apelin

receptors: From signaling to antidiabetic strategy. *Eur J Pharmacol.* 15 sept 2015;763(Pt B):149- 59.

223. Habchi M, Duvillard L, Cottet V, Brindisi M-C, Bouillet B, Beacco M, et al. Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control. *Clin Endocrinol (Oxf).* nov 2014;81(5):696- 701.

224. Cavallo MG, Sentinelli F, Barchetta I, Costantino C, Incani M, Perra L, et al. Altered glucose homeostasis is associated with increased serum apelin levels in type 2 diabetes mellitus. *PloS One.* 2012;7(12):e51236.

225. Alexiadou K, Kokkinos A, Liatis S, Perrea D, Katsilambros N, Tentolouris N. Differences in plasma apelin and visfatin levels between patients with type 1 diabetes mellitus and healthy subjects and response after acute hyperglycemia and insulin administration. *Horm Athens Greece.* déc 2012;11(4):444- 50.

226. Akinci B, Celtik A, Tunali S, Genc S, Yuksel F, Secil M, et al. Circulating apelin levels are associated with cardiometabolic risk factors in women with previous gestational diabetes. *Arch Gynecol Obstet.* avr 2014;289(4):787- 93.

227. Boyadzhieva M, Atanasova I, Zacharieva S, Kedikova S. Adipocytokines during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes and healthy controls. *J Endocrinol Invest.* déc 2013;36(11):944- 9.

228. Bays HE. Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res.* août 2004;12(8):1197- 211.

229. Pirola L, Ferraz JC. Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. *World J Biol Chem.* 26 mai 2017;8(2):120.

230. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reprod Camb Engl.* mars 2017;153(3):R97- 108.

231. Dubé E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, et al. Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-

term placenta. *Biol Reprod.* juill 2012;87(1):14, 1- 11.

232. Stang J, Huffman LG. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Obesity, Reproduction, and Pregnancy Outcomes. *J Acad Nutr Diet.* avr 2016;116(4):677- 91.

233. Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care.* juin 2009;32(6):1076- 80.

234. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics.* mars 2005;115(3):e290-296.

235. Tessier DR, Ferraro ZM, Gruslin A. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. *Placenta.* mars 2013;34(3):205- 11.

236. Kourtis A, Gkiomisi A, Mouzaki M, Makedou K, Anastasilakis AD, Toulis KA, et al. Apelin levels in normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* sept 2011;75(3):367- 71.

237. Oncul M, Tuten A, Erman H, Gelisgen R, Benian A, Uzun H. Maternal and cord blood apelin, resistin and visfatin levels in gestational diabetes mellitus. *Minerva Med.* oct 2013;104(5):527- 35.

238. Murray SA, Morgan JL, Kane C, Sharma Y, Heffner CS, Lake J, et al. Mouse gestation length is genetically determined. *PloS One.* 2010;5(8):e12418.

239. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SAL. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp JoVE.* 2012;(67).

240. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. scd lille. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* déc 2008;295(6):E1323-1332.

241. Wu H, Zhang Z, Du Q, Yao H, Li Z, Wu L, et al. Down-regulation of Apelin in obesity-related hypertensive rats induced by high-fat diet: Possible role of angiotensin II-AT1R system. *Int J Cardiol.* 2011;152(Suppl 1):S50- 1.

242. Mayeur S, Lancel S, Theys N, Lukaszewski M-A, Duban-Deweere S, Bastide B, et al. Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1 janv 2013;304(1):E14-22.
243. Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, et al. Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* juin 2010;298(6):E1161-1169.
244. Surwit RS, Wang S, Petro AE, Sanchis D, Raimbault S, Ricquier D, et al. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 mars 1998;95(7):4061-5.
245. Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Cacho J, Herrera E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* août 2003;285(2):E318-328.
246. Josephs T, Waugh H, Kokay I, Grattan D, Thompson M. Fasting-induced adipose factor identified as a key adipokine that is up-regulated in white adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *J Endocrinol.* août 2007;194(2):305-12.
247. Guedj A-M. When should we screen for gestational diabetes? *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* déc 2010;39(8 Suppl 2):S214-219.
248. Virally M, Laloi-Michelin M. [Methods of screening of gestational diabetes between 24 and 28 weeks' gestation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* déc 2010;39(8 Suppl 2):S220-238.
249. Cosson E. Diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* déc 2010;39(8 Suppl 2):S239-250.
250. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull.* 1992;112(1):155-159.
251. Marousez L. Etude de l'apeline et de son récepteur APJ dans la triade mère-lait-nouveau-né : rôle dans l'absorption intestinale du glucose. Mémoire de Master 2 Recherche;

2016.

252. Clee SM, Attie AD. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr Rev.* févr 2007;28(1):48- 83.

253. Roberts CK, Vaziri ND, Liang KH, Barnard RJ. Reversibility of chronic experimental syndrome X by diet modification. *Hypertension.* mai 2001;37(5):1323- 8.

254. Tschöp M, Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* 2001;109(6):307- 19.

255. Louiset E. et al. Edimark Santé : Article - Perturbation du rythme circadien du cortisol. 2009. Disponible sur: <http://www.edimark.fr/publications/articles/perturbation-du-rythme-circadien-du-cortisol/15325>

256. Paradisi G, Biaggi A, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy : association with endothelial dysfunction. *Diabetes Care.* mars 2002;25(3):560- 4.

257. Sánchez-Vera I, Bonet B, Viana M, Quintanar A, Martín MD, Blanco P, et al. Changes in plasma lipids and increased low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in pregnancies complicated by gestational diabetes: consequences of obesity. *Metabolism.* nov 2007;56(11):1527- 33.

258. Malassiné A. Variabilité morphologique et fonctionnelle du placenta. [Httpwwwem-Premiumcomdoc-Distantuniv-Lille2frdatarevues12979589v0029i0701001734](http://www.em-premium.com/doc-distant.univ-lille2.fr/data/revues/12979589v0029i0701001734) [Internet]. [cité 8 juill 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.doc-distant.univ-lille2.fr/article/4578/resultatrecherche/1>

259. Enders AC, Welsh AO. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. *J Exp Zool.* 1 sept 1993;266(6):578- 87.

260. Scifres C, Feghali M, Althouse AD, Caritis S, Catov J. Adverse Outcomes and Potential Targets for Intervention in Gestational Diabetes and Obesity. *Obstet Gynecol.* août 2015;126(2):316- 25.

261. Attané C, Daviaud D, Dray C, Dusaulcy R, Masseboeuf M, Prévot D, et al. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J Mol Endocrinol.* févr 2011;46(1):21- 8.
262. Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, et al. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology.* juin 2007;148(6):2690- 7.
263. Fleischer A, Schulman H, Farmakides G, Bracero L, Grunfeld L, Rochelson B, et al. Uterine artery Doppler velocimetry in pregnant women with hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* avr 1986;154(4):806- 13.
264. Hehir MP, Morrison JJ. The adipokine apelin and human uterine contractility. *Am J Obstet Gynecol.* avr 2012;206(4):359.e1-5.
265. Lim R, Barker G, Riley C, Lappas M. Apelin Is Decreased With Human Preterm and Term Labor and Regulates Prolabor Mediators in Human Primary Amnion Cells. *Reprod Sci.* 1 août 2013;20(8):957- 67.
266. Eberlé D, Marousez L, Butruille L, Hanssens S, Lecoutre S, Guinez C, et al. Physiology of the apelinergic system during gestation: focus on the fetoplacental unit in normal and complicated pregnancy. *J Endocrinol.* 2017;
267. Hering L, Herse F, Geusens N, Verlohren S, Wenzel K, Staff AC, et al. Effects of circulating and local uteroplacental angiotensin II in rat pregnancy. *Hypertens Dallas Tex* 1979. août 2010;56(2):311- 8.
268. Verlohren S, Niehoff M, Hering L, Geusens N, Herse F, Tintu AN, et al. Uterine vascular function in a transgenic preeclampsia rat model. *Hypertens Dallas Tex* 1979. févr 2008;51(2):547- 53.
269. Altmäe S, Segura MT, Esteban FJ, Bartel S, Brandi P, Irmeler M, et al. Maternal Pre-Pregnancy Obesity Is Associated with Altered Placental Transcriptome. *PloS One.* 2017;12(1):e0169223.

270. Capobianco E, Fornes D, Pelesson M, White V, Jawerbaum A. Placental alterations in a new experimental model of gestational diabetes generated by intrauterine programming in the offspring of mild diabetic rats. *Placenta*. 1 sept 2014;35(9):A27.
271. Badillo-Suárez PA, Rodríguez-Cruz M, Nieves-Morales X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 27 juin 2017;
272. Bautista CJ, Montaña S, Ramirez V, Morales A, Nathanielsz PW, Bobadilla NA, et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *Br J Nutr*. 14 févr 2016;115(3):538- 46.
273. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. nov 2015;91(11):629- 35.
274. Fields DA, Schneider CR, Pavela G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. *Obes Silver Spring Md*. juin 2016;24(6):1213- 21.
275. Çatlı G, Olgaç Dünder N, Dünder BN. Adipokines in breast milk: an update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. déc 2014;6(4):192- 201.
276. Wang G, Qi X, Wei W, Englander EW, Greeley GH. Characterization of the 5'-regulatory regions of the rat and human apelin genes and regulation of breast apelin by USF. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. déc 2006;20(14):2639- 41.
277. Kuganathan S, Gridneva Z, Lai CT, Hepworth AR, Mark PJ, Kakulas F, et al. Associations between Maternal Body Composition and Appetite Hormones and Macronutrients in Human Milk. *Nutrients*. 9 mars 2017;9(3).
278. Palou A, Picó C. Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite*. févr 2009;52(1):249- 52.
279. Yang P, Kuc RE, Brame AL, Dyson A, Singer M, Glen RC, et al. [Pyr(1)]Apelin-13(1-12) Is a Biologically Active ACE2 Metabolite of the Endogenous Cardiovascular Peptide

[Pyr(1)]Apelin-13. *Front Neurosci.* 2017;11:92.