



**HAL**  
open science

# Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition in utero au diabète maternel chez le rat

Abdallah Dib

## ► To cite this version:

Abdallah Dib. Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition in utero au diabète maternel chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2016. Français. NNT : 2016ANGE0066 . tel-02459311

**HAL Id: tel-02459311**

**<https://theses.hal.science/tel-02459311>**

Submitted on 29 Jan 2020

**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.

# Thèse de Doctorat

Abdallah DIB

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions*

Spécialité : *Physiologie et Physiopathologie Humaine*

Unité de recherche : *Laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée (BNMI), UMR CNRS6214*

– *INSERM U1083 – Faculté de Médecine, 49045 ANGERS Cedex*

## Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

### JURY

Rapporteurs : **Pr Catherine VERGELY**, Professeur des Universités, INSERM UMR866, Dijon  
**Dr Pierre-Louis THARAUX**, Directeur de Recherche, INSERM UMR970, Paris

Examineurs : **Dr Carmen MARTINEZ**, Directrice de Recherche, INSERM U1063, Anger

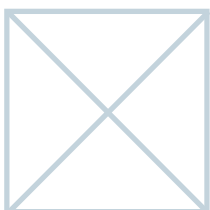
Directeur de Thèse : **Dr Céline FASSOT**, Chargée de Recherche, UMR CNRS6214 - INSERM U1083, Angers

Co-directeur de Thèse : **Dr Ziad FAJLOUN**, Directeur de Recherche, Centre Azm pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications,  
Tripoli



# Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

Abdallah DIB



Soutenu publiquement le :  
03 novembre 2016



# REMERCIEMENTS

Je remercie Mme Catherine Vergely et Mr Pierre-Louis Tharaux pour avoir accepté de participer à ce jury et évaluer ce travail de thèse en tant que Rapporteurs.

Je souhaite remercier Mme Carmen Martinez pour sa participation au jury en tant qu'Examinatrice.

Je remercie très chaleureusement Mr Daniel Henrion pour m'avoir accueilli au sein du BNMI pendant toutes ces années. Merci pour votre soutien, votre gentillesse, votre aide, vos encouragements et votre confiance, merci pour toutes les discussions scientifiques et vos conseils avisés.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse Mme Céline FASSOT pour avoir encadré ces travaux de recherche tout au long de ces années. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet qui m'a passionné. Merci pour l'autonomie et la confiance que vous m'avez accordé, ainsi que votre disponibilité, particulièrement lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie de tout mon cœur mon co-directeur de thèse, Mr Ziad Fajloun. Merci à vous pour votre écoute et vos conseils, ainsi que votre soutien depuis le début de cette histoire, de mon arrivée en France jusqu'à aujourd'hui.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire que j'ai pu croiser tout au long de mon parcours. Un grand merci à Jennifer, Linda, Emilie, Anne-laure pour m'avoir apporté votre aide pour ces travaux de recherche. Merci à Gilles, Mathilde, Eric, Marc-Antoine, Chau, Céline, Julie, Antoine, Laurent pour avoir partagé votre expérience et votre savoir-faire. Merci à vous pour votre bonne humeur.

Je tiens également à remercier Tristan, Emmanuel, Walid, Khalil, Cyrielle, Charlotte, Joseph, Nada-Joe, Simon, Zineb, Lucille, Oussama, Louis et Agnès pour la bonne ambiance en salle de manip et tous les bons moments hors labo qu'on a pu partager ensemble.

Merci aussi à mes amis libanais, hors laboratoire mais dans le domaine de la recherche, chacun dans sa discipline (Alaa, Hussein, Zaher, Ahmad, Ali, Radwan, Bachar, Ghassan .....). Merci pour votre amitié et votre bienveillance.

Je tiens à remercier sincèrement et du fond du cœur ma famille. Sans votre amour et votre soutien, je ne serais jamais allé aussi loin. J'ai bien conscience de tout ce que je vous dois.

Pour finir, merci à mes petits rats qui m'ont supporté durant toutes ces années.

# TABLE DES MATIERES

## LISTE DES ABREVIATIONS

## TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAU

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : DIABETE MATERNEL ET PROGRAMMATION FŒTALE DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Origines fœtale et périnatale des maladies de l'adulte.....</b>	<b>2</b>
1.1. Historique et concept de programmation fœtale .....	2
1.2. Hypothèse mécanistiques de la programmation fœtale .....	3
1.2.1. Plasticité développementale.....	4
1.2.2. Phénotype d'épargne .....	4
1.2.3. Phénomène de rattrapage .....	6
1.2.4. Epigénétique .....	6
<i>Méthylation de l'ADN.....</i>	<i>7</i>
<i>Modification des histones .....</i>	<i>7</i>
<b>2. Diabète maternel et programmation fœtale.....</b>	<b>10</b>
2.1. Définition du diabète .....	12
2.2. Données épidémiologiques .....	12
2.3. Modèles expérimentaux de diabète maternel.....	14
2.3.1. Modèles expérimentaux induits par la streptozotocine .....	14
2.3.2. Mécanismes d'action de la streptozotocine.....	15
2.4. La programmation fœtale des maladies cardiovasculaires .....	17
2.4.1. Diabète maternel, développement rénal et hypertension artérielle .....	19
2.4.2. Diabète maternel, fonction vasculaire et hypertension artérielle.....	20
<b>CHAPITRE 2 : SYSTEME VASCULAIRE.....</b>	<b>22</b>
<b>1. Description du système vasculaire.....</b>	<b>22</b>
<b>2. Physiologie et mécanique du système vasculaire.....</b>	<b>23</b>
2.1. Physiologie.....	23
2.2. Mécanique.....	26
2.2.1. Endothélium et réactivité vasculaire.....	26
2.2.2. Cellules musculaires lisses et réactivité vasculaire.....	31
<b>3. Remodelage vasculaire.....</b>	<b>33</b>
3.1. Remodelage artériel et hypertension.....	35
3.1.1. Artères de conductance et remodelage dû à l'hypertension artérielle .....	35
<i>Mécanismes.....</i>	<i>35</i>
3.1.2. Artères de résistance et remodelage dû à l'hypertension artérielle .....	36
<i>Mécanismes.....</i>	<i>37</i>
3.2. Remodelage artériel et variations de flux sanguin .....	40
3.2.1. Artères de conductance et remodelage en réponse à des variations de flux .....	40
<i>Mécanismes.....</i>	<i>41</i>
3.2.2. Artères de résistance et remodelage en réponse à des variations de flux.....	42
<i>Mécanismes (Figure 18).....</i>	<i>43</i>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>49</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>59</b>

<b>PREMIERE PARTIE: EFFETS DE L'EXPOSITION <i>IN UTERO</i> AU DIABETE MATERNEL SUR LA FONCTION DES ARTERES MESENTERIQUES CHEZ LE MALE .....</b>	<b>60</b>
<b>DEUXIEME PARTIE: EFFETS DE L'EXPOSITION <i>IN UTERO</i> AU DIABETE MATERNEL SUR LE REMODELAGE VASCULAIRE CHEZ LE MALE.....</b>	<b>78</b>
<b>TROISIEME PARTIE: IMPACT DE L'EXPOSITION <i>IN UTERO</i> AU DIABETE MATERNEL SUR LA DESCENDANCE FEMELLE .....</b>	<b>110</b>
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>119</b>
<b>ET.....</b>	<b>119</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>143</b>
Abstract.....	1

## Liste des abréviations

Ach : Acétylcholine	MMPs : Métalloprotéases matricielles
AngII : Angiotensine II	NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
AT1R : Récepteur 1 de l'angiotensine II	NF-KB : facteur nucléaire kappa B
bFGF : Basic fibroblast growth factor,	NO : Monoxyde d'azote
c-SRC : proto-oncogene tyrosine-protein kinase	p38 MAPK : Mitogène p38 protéine kinase
CMVLs : Cellules musculaires vasculaires lisses	PAD : Pression artérielle diastolique
CMO : Rat issu de mère contrôle	PARP : poly(ADP-ribose) polymérase
COX-1 : Cyclooxygénase 1	PAS : Pression artérielle systolique
COX-2 : Cyclooxygénase 2	PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
DMO : rat issu de mère diabétique	PGI <sub>2</sub> : Prostacycline
DNMT : ADN méthyltransférase	Phe : Phényléphrine
DOHaD : Developmental Origin of Health and Disease	PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
DT1 : Diabète de type 1	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
DT2 : Diabète de type 2	SNP : nitroprussiate de sodium
EDHF : Facteur hyperpolarisant de l'endothélium	SRA : Système rénine-angiotensine
EGF : Facteur de croissance épidermique	STZ : Streptozotocine
eNOS : NO synthase endothéliale	TGFβ : Transforming growth factor beta
ERK : Extracellular signal-regulated kinase	TNFα : Facteur de nécrose tumorale
ET-1 : Endothéline 1	TNFα : Tumor necrosis factor alpha
FAK : Focal Adhesion Kinase	tTG : Transglutaminase tissulaire
GDM : Diabète gestationnel	TXA2 : Thromboxane A2
GLUT2 : Transporteur 2 du glucose	VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1
HIF-1 : Facteur 1 induit par l'hypoxie	
HTA : Hypertension artérielle	
IGF-1 : Insulin-like growth factor-1	
IP : Récepteur de la prostacycline	
JNKs : c-Jun N-terminal kinase	
L-NAME : NG-nitro-L-arginine méthyl estérase	
MAPK : Mitogen-activated protein kinase	
MEC : Matrice extracellulaire	
MLC : Chaîne légère de la myosine	
MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine	
MLCP : Phosphatase des chaînes légères de la myosine	

# Table des figures et des tableaux

<b>Figure 1:</b> Relation entre poids de naissance et intolérance au glucose.....	3
<b>Figure 2:</b> Hypothèse du « Phénotype d'épargne » .....	5
<b>Figure 3:</b> Impact des perturbations de l'apport nutritionnel maternel sur le fœtus en fonction des périodes de développement .....	5
<b>Figure 4:</b> Méthylation de l'ADN .....	7
<b>Figure 5:</b> Modification des histones .....	8
<b>Figure 6:</b> Répartition mondiale du nombre de personnes atteintes de diabète d'après la Fédération Internationale du Diabète .....	13
<b>Figure 7:</b> Structure et effets de la streptozotocine (STZ) sur les cellules $\beta$ du pancréas.....	16
<b>Figure 8:</b> Influence de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie maternelles sur le développement fœtal et post-natal.....	18
<b>Figure 9:</b> Composition de l'arbre vasculaire avec ses différents types de vaisseaux.....	23
<b>Figure 10:</b> Différence entre contrainte pariétale et contrainte de cisaillement .....	26
<b>Figure 11:</b> Production de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs par l'endothélium vasculaire ....	27
<b>Figure 12:</b> Les 2 voies d'activation de la eNOS .....	28
<b>Figure 13:</b> Mécanismes de la contraction et relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire .....	33
<b>Figure 14:</b> Les différents types de remodelage existants.....	34
<b>Figure 15:</b> Mécanismes physiopathologiques conduisant au remodelage des artères de résistance en cas d'hypertension artérielle.....	37
<b>Figure 16:</b> Voies de signalisation induites par l'angiotensine II (AngII) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules musculaires lisses vasculaires .....	38
<b>Figure 17:</b> Représentation du système de ligatures.....	43
<b>Figure 18:</b> Mécanismes de remodelage en réponse à des variations de débit .....	45
<b>Figure 19:</b> Technique de myographie .....	51
<b>Figure 20:</b> Montage photo montrant l'emplacement de chaque ligature (tirets bleus) ainsi que le résultat des variations chroniques de flux sur des coupes d'artères mésentériques.....	52
<b>Figure 21:</b> Montage photo montrant l'emplacement de la ligature sur la carotide gauche (CAG ; emplacement précisé par un tiret noir) ainsi que le résultat des variations chroniques de flux sur des coupes de carotide .....	53
<b>Figure 22:</b> Principe de l'artériographie.....	55
<b>Figure 23:</b> Plan expérimental retraçant les différentes études.....	58
<b>Figure 24:</b> Diamètre passif des artères mésentériques haut-flux (HF) et normal-flux (NF) 7 jours après ligature de rats mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO) .....	106
<b>Figure 25:</b> Histomorphométrie des artères mésentériques en réponse à une augmentation de flux 7 jours après ligature chez des rats mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO) .....	107

<b>Figure 26:</b> Remodelage de la carotide en réponse à des variations de flux après 4 semaines de ligature (Operated) ou sans ligature (Sham) chez des mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO).....	108
<b>Figure 27:</b> Activité de la Transglutaminase 2 sur des coupes de carotide de rats mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO) .....	109
<b>Figure 28:</b> Poids corporel, ratios poids du cœur/poids corporel et poids du cœur sans oreillette/poids du cœur des rates âgées de 3 mois issues de mères contrôles (CMO) et de mères diabétiques (DMO) .....	116
<b>Figure 29:</b> Diamètres interne et externe, surface cross-sectionnelle de la média (MCSA) et rapport surface média/surface lumière (M/L) de coupes transversales d'artères mésentériques haut-flux (HF), normal-flux (NF), et bas-flux (BF) de rates âgées de 3 mois issus de mères diabétiques après 7 jours de ligature .....	116
<b>Figure 30:</b> Variation du diamètre passif d'artères mésentériques haut-flux (HF), normal-flux (NF) et bas-flux (BF) .....	117
<b>Figure 31:</b> Schéma récapitulatif des différents résultats obtenus au cours de cette thèse chez le rat mâle issu de mère contrôle (CMO) ou de mère diabétique (DMO) à 3 et 18 mois.....	120
<b>Tableau 1:</b> Influence des facteurs environnementaux et maternels sur la santé au cours de la vie adulte.....	11
<b>Tableau 2:</b> Rôles de l'endothélium dans la mécanique artérielle.....	26
<b>Tableau 3:</b> Etudes expérimentales et cliniques démontrant des différences mâle/femelle sur les effets du développement programmé.....	114
<b>Tableau 4:</b> Pression artérielle systolique (PAS), moyenne (PAM), diastolique (PAD) et fréquence cardiaque (FC) chez les rates âgées de 3 mois issues de mères contrôles (CMO) et de mères diabétiques (DMO).....	115

# INTRODUCTION

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



Les maladies cardiovasculaires, associées ou non aux maladies métaboliques, sont les principales causes de mortalité dans les pays développés (Meng et al., 2013). Malgré tous les traitements existants, leur prévalence ne cesse d'augmenter. A eux seuls, la suralimentation, l'inactivité physique et/ou les facteurs génétiques ne peuvent expliquer l'augmentation de la prévalence de ces pathologies.

Les modifications de l'environnement intra-utérin sont maintenant reconnues comme étant une cause importante de souffrance fœtale pouvant influencer son développement. Le fœtus est ainsi amené à répondre en modifiant la structure et/ou de la fonction de ses organes. Cette adaptation anormale en réponse à un environnement post-natal spécifique peut alors être le point de départ du développement de maladies à l'âge adulte.

Le développement fœtal dépend principalement de l'apport maternel en nutriments. Un métabolisme maternel perturbé et/ou une nutrition maternelle inappropriée (sous-alimentation, obésité, hyperglycémie maternelle, corticothérapie, hypoxie intra-utérine, insuffisance *utero*-placentaire) aboutissent à un environnement intra-utérin défavorable obligeant le fœtus à s'adapter. Ce processus d'adaptation, tant au niveau structurel que fonctionnel, entraîne de profondes modifications dans la mise en place des différents organes et de leurs fonctions. Les conséquences de ces adaptations vont perdurer bien au delà de la vie fœtale, influençant la santé de l'individu tout au long de sa vie. Les données épidémiologiques suggèrent qu'un environnement intra-utérin défavorable (manque ou excès de nutriments) serait associé à un risque accru de développer des maladies (cardiovasculaires ou métaboliques) à l'âge adulte (Lehnen et al., 2013). De ces différentes observations épidémiologiques est née l'hypothèse de la «**Programmation Fœtale**» des pathologies de l'adulte, suggérant que certaines de ces maladies peuvent être déterminées avant la naissance par un développement altéré du fœtus.

## Chapitre 1 : Diabète maternel et programmation fœtale des maladies cardiovasculaires

### 1. Origines fœtale et périnatale des maladies de l'adulte

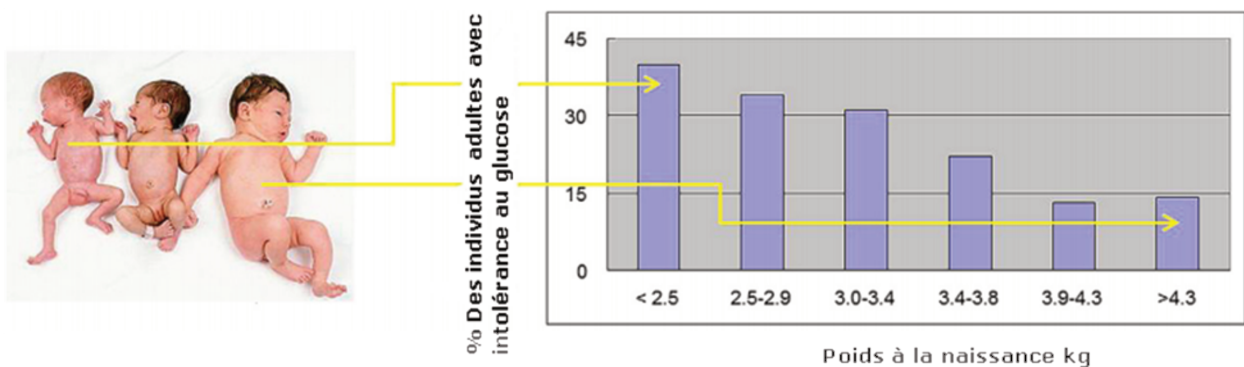
#### 1.1. Historique et concept de programmation fœtale

L'hypothèse de l'origine fœtale des maladies de l'adulte (DOHaD : *developmental origin of health and disease*) a été formulée pour la première fois par Barker et coll. notant qu'un faible poids de naissance était associé non seulement à un développement fœtal perturbé mais également à une altération de la santé à l'âge adulte (Barker, 1997; Barker et al., 1989a; Ravelli et al., 1999). En effet, en se basant sur l'étude d'une cohorte de 16 000 adultes originaires de Preston et du comté d'Hertfordshire en Angleterre, David Barker observa que la première cause de mortalité infantile était liée au faible poids de naissance. De plus, les enfants

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

nés hypotrophes qui survivaient, semblaient présenter plus de risques de développer une maladie coronarienne à l'âge adulte (Barker and Osmond, 1986) ; dans cette même population, le taux de décès par maladies cardiovasculaires était inversement proportionnel au poids de naissance.

Depuis, un faible poids de naissance (inférieur à 2,5 kg) a été associé à de très nombreuses maladies chroniques telles que les maladies coronariennes, le diabète de type 2 (DT2), le cancer, l'ostéoporose et diverses maladies psychiatriques (Barker et al., 2009; Lahti et al., 2010). Barker et son équipe ont non seulement montré que les hommes nés avec un petit poids de naissance avaient 6 fois plus de risque de développer un DT2 que les hommes nés avec un poids de naissance normal (Hillier et al., 2007; Pettitt et al., 1987), mais également qu'ils avaient un risque accru de mourir de maladies coronariennes (Barker et al., 1989b, 1993a). La poursuite des études épidémiologiques a permis de mettre en évidence des associations significatives entre poids de naissance, poids durant la petite enfance et mortalité cardiovasculaire ; ceci a permis d'établir formellement la relation entre croissance pré et post-natale et maladies cardiovasculaires, hypertension artérielle, intolérance au glucose, résistance à l'insuline, DT2 à l'âge adulte (McMillen and Robinson, 2005) (Figure 1).



**Figure 1:** Relation entre poids de naissance et intolérance au glucose : les études épidémiologiques de David Barker, dans les années 1980, ont conduit à la proposition que les événements de la vie fœtale pourraient influencer le risque à long terme de maladies cardiovasculaire et métabolique (dont l'intolérance au glucose). Adapté de Portha et coll (Portha et al., 2014).

## 1.2. Hypothèse mécanistiques de la programmation fœtale

Ces dernières années, de nombreuses hypothèses mécanistiques ont été proposées pour tenter d'expliquer les bases biologiques de l'association entre petit poids de naissance et maladies de l'adulte. Il a ainsi été montré que l'origine fœtale et périnatale des maladies de l'adulte reposait sur le concept de « programmation » définie par 3 notions complémentaires : la plasticité développementale, le phénotype d'épargne et le phénomène de rattrapage.

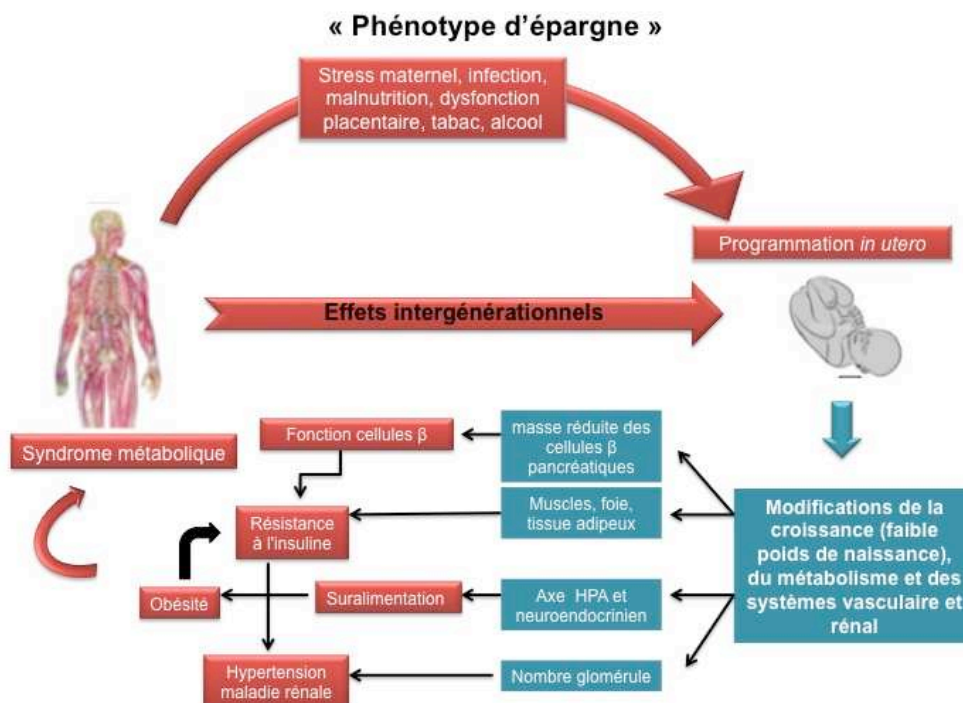
**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

### 1.2.1. Plasticité développementale

Un génotype donné peut conduire à des phénotypes différents en fonction des conditions environnementales (Gicquel et al., 2008) ; ainsi, la théorie de l'origine développementale des maladies repose sur le principe de « plasticité développementale », c'est à dire qu'un génotype, influencé par des événements intra-utérins spécifiques, a la capacité de produire différents phénotypes dont le but est de s'ajuster le mieux possible à l'environnement.

### 1.2.2. Phénotype d'épargne

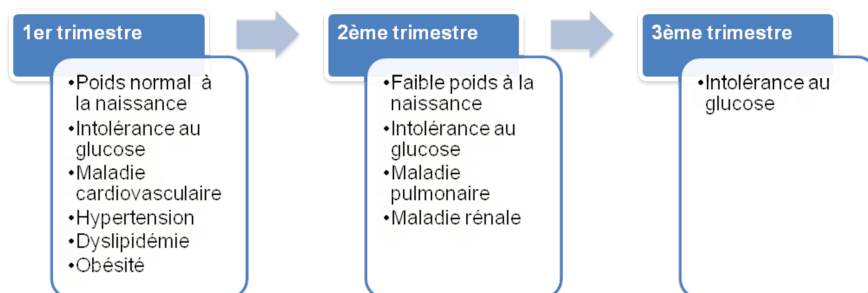
En 1992, Hales et Barker introduisent la notion de « phénotype d'épargne » (Hales and Barker, 1992). En cas de malnutrition fœtale ou d'apport insuffisant en nutriments (carence maternelle), le fœtus s'adapte en favorisant la croissance des organes vitaux tel que le cerveau ou le cœur au détriment des autres tissus (muscle, reins, pancréas...), dans le but d'optimiser ses chances de survie après la naissance. Ainsi ces réponses fœtales adaptatives permettent une utilisation plus efficace des nutriments à disposition, conférant ainsi un réel avantage développemental en période de carence nutritionnelle. Pourtant ces mécanismes deviendraient inappropriés, voire délétères, dans un milieu environnemental post-natal plus favorable en terme nutritionnel. Il y aurait alors un déséquilibre prédisposant à des altérations de la croissance, de la fonction des organes et aboutirait au développement d'un syndrome X, appelé également syndrome métabolique (ensemble de troubles métaboliques incluant une résistance à l'insuline, une diminution du HDL-cholestérol, une hypertriglycéridémie, un surpoids abdominal, tous associés à une hypertension artérielle, un état inflammatoire et un état thrombotique) (Hales and Barker, 2001) (Figure 2).



**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

**Figure 2:** Hypothèse du « Phénotype d'épargne » : représentation schématique illustrant les effets de la programmation d'un environnement *in utero* sub-optimale, alimentaire ou autre, sur le croissance précoce et le développement ultérieur du syndrome métabolique (Hales and Barker, 2001).

Cette théorie a pu être validée grâce aux observations réalisées chez les personnes ayant été exposées *in utero* à la famine d'Amsterdam (hiver 1944-1945). Durant la courte période de famine, les études ont montré que l'exposition *in utero* à la famine pendant la seconde moitié de la grossesse était associée à un poids plus faible à la naissance et à une diminution de la tolérance au glucose à l'âge adulte (Ravelli et al., 1998); au contraire, les sujets exposés à la famine au début de leur développement embryonnaire avaient un poids à la naissance normal, mais étaient plus à risque d'être obèses, d'avoir un profil lipidique athérogénique et de développer une hypertension à l'âge adulte (Ravelli et al., 1999; Roseboom et al., 2000a, 2000b). Ces résultats ont permis de montrer, pour la première fois, que la dénutrition au cours de la grossesse avait un impact sur le devenir métabolique de la personne (Jiménez-Chillarón et al., 2012) et qu'il existait des fenêtres de programmation en lien avec les stades critiques du développement (Figure 3).



**Figure 3:** Impact des perturbations de l'apport nutritionnel maternel sur le fœtus en fonction des périodes de développement : suivant les périodes du développement au cours desquelles l'apport nutritionnel maternel est perturbé, les effets après la naissance sont différents (Roseboom et al., 2006).

Cependant, les perturbations métaboliques à long terme observées chez des sujets nés avec un petit poids de naissance ne seraient retrouvées que lorsque l'environnement post-natal s'oppose à l'environnement *in utero*, suggérant ainsi l'hypothèse « d'incompatibilité » qui peut expliquer l'absence de corrélation positive entre un petit poids de naissance et des modifications du métabolisme chez les enfants nés au cours de la grande famine de Leningrad (1941-1944). Le suivi des patients nés avant ou pendant le siège de Leningrad a montré que les effets de l'exposition *in utero* ou post-natale immédiate étaient similaires et qu'une malnutrition

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

pendant cette longue période de la vie n'induisait pas systématiquement une augmentation des maladies chroniques de l'adulte (Stanner et al., 1997). L'absence de décalage nutritionnel entre le milieu intra-utérin et le milieu post-natal permet d'expliquer ces résultats (Vickers, 2011).

Aussi, la mise en place d'un phénotype d'épargne, s'adaptant à la vie intra-utérine mais pas à l'environnement post-natal, si celui-ci est trop différent de l'environnement fœtal, aboutit à un déséquilibre et au développement de maladies à l'âge adulte.

### 1.2.3. Phénomène de rattrapage

Ce phénotype d'épargne aboutit généralement à un phénomène de compensation mis en évidence par une croissance accélérée : « phénomène de rattrapage ». Ce mécanisme a pour fonction de rétablir un état de santé acceptable à court terme. Mais il est évident que le rattrapage staturo-pondéral se traduit par une surcompensation durant laquelle l'organisme dépasse le poids normal. En effet, cette surcompensation entraîne une augmentation du stockage des nutriments dans le tissu adipeux, un réarrangement des mitochondries du muscle squelettique et une augmentation du stress oxydant (Simmons, 2006) aboutissant au développement d'une obésité, d'une résistance à l'insuline, d'un diabète de type 2 ou d'un syndrome métabolique (Luo et al., 2006; Ong et al., 2000).

### 1.2.4. Epigénétique

Chacune de nos cellules contient l'ensemble de notre patrimoine génétique: 46 chromosomes hérités de nos parents sur lesquels on compte environ 25 000 gènes. Mais si toutes nos cellules contiennent la même information, elles n'en font pas toutes le même usage : une cellule de la peau ne ressemble en rien à un neurone, une cellule du foie n'a pas les mêmes fonctions qu'une cellule du cœur. De même, deux jumeaux qui partagent le même génome ne sont jamais parfaitement identiques ! Dans ces exemples et dans bien d'autres, la clé du mystère se nomme «épigénétique». En 1974, Conrad Hal Waddington fut le premier à prononcer le terme «épigénétique», qu'il définit comme étant l'interaction entre un organisme et son environnement aboutissant à un phénotype particulier (Waddington, 1974). A l'heure actuelle, l'épigénétique est l'étude des changements d'activité des gènes - donc des changements de caractères - qui sont transmis au fil des divisions cellulaires ou des générations sans modification de la séquence d'ADN.

Le concept d'épigénétique a émergé pour promouvoir un mécanisme potentiel de différence de susceptibilité face à une maladie, en lien avec les facteurs de l'environnement. La présence de ces marques épigénétiques, et donc de l'expression des gènes, est modulée par l'environnement cellulaire ou physiologique. Les gènes et les cellules sont particulièrement sensibles aux modifications environnementales au cours du développement embryonnaire et dans les premiers mois de la vie. La sensibilité de l'épigénome à l'environnement semble persister tout au long de l'existence mais diminue progressivement avec le ralentissement de la croissance (Gluckman et al., 2009).

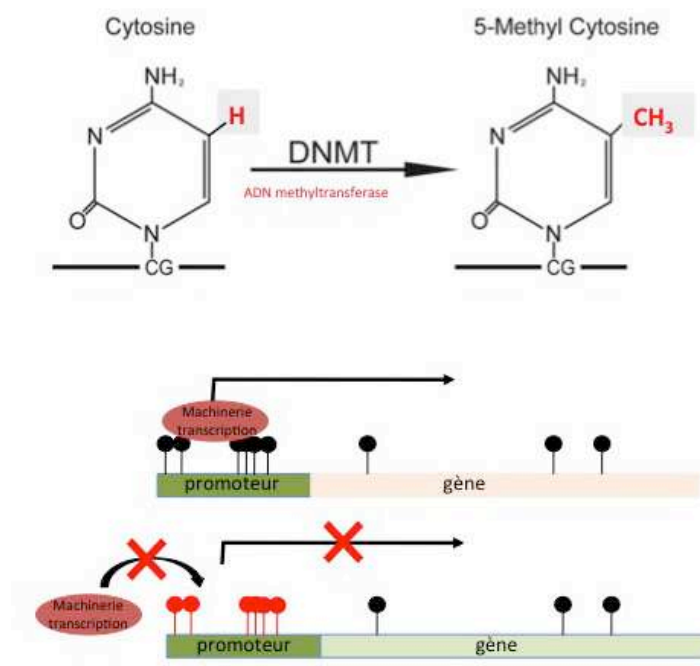
#### a) Mécanismes épigénétiques

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

Les deux principaux mécanismes épigénétiques sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones.

### Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN fut la première modification épigénétique identifiée et est, jusqu'à présent, celle la plus étudiée et la mieux comprise. Le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes fut initialement proposé par des résultats publiés dans deux manuscrits distincts en 1975, celui de Riggs et celui de Holliday et Pugh. À cette époque, les deux équipes suggèrent que la méthylation enzymatique des cytosines de l'ADN suivies d'une guanine (dinucléotides CpG, stables suite aux divisions cellulaires mitotiques) module les gènes en activant ou en réprimant leur expression, à des moments précis du développement embryonnaire (Holliday and Pugh, 1975; Riggs, 1975). Ces phénomènes de méthylation sont conservés lors de la réplication de l'ADN par l'action des ADN méthyltransférases (DNMTs) assurant ainsi la pérennité des modifications épigénétiques (Waterland and Garza, 1999). Les îlots CpG se situant principalement dans les régions promotrices du gène, leur méthylation bloque la machinerie enzymatique permettant normalement la transcription de l'ADN (Figure 4).



**Figure 4:** Méthylation de l'ADN : une fois le C5 de la cytosine méthylée, la machinerie transcriptionnelle n'est plus capable de se fixer et la transcription est bloquée.

### Modification des histones

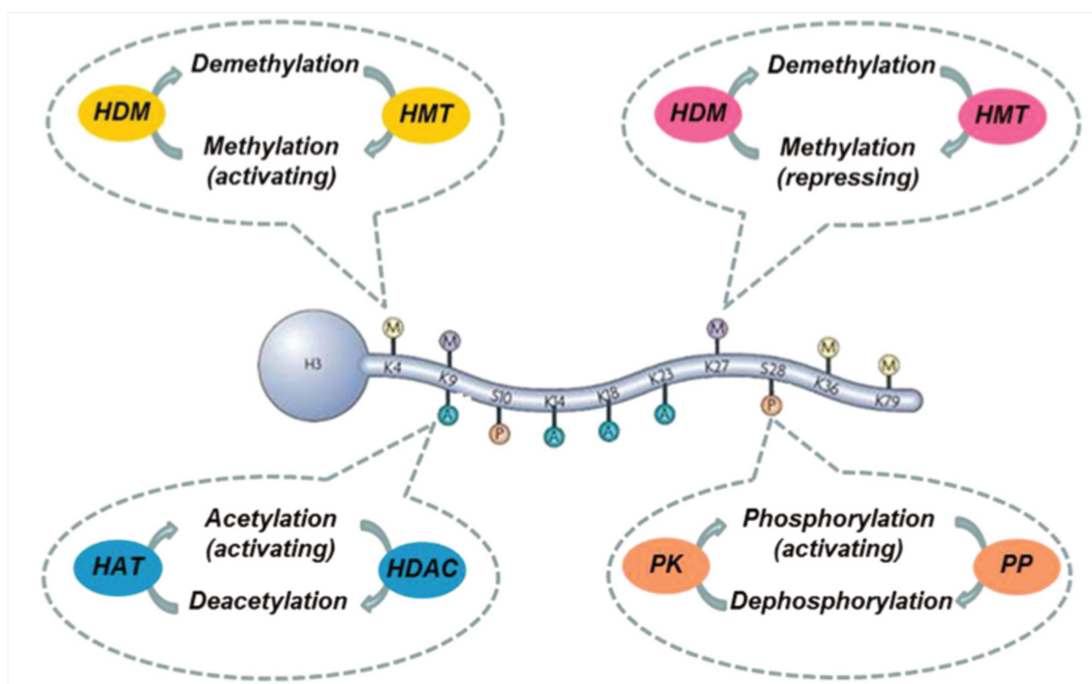
Les histones, quant à elles, sont sujettes à des modifications post-traductionnelles telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation ou l'ubiquitination. L'acétylation se produit sur les résidus lysine

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



principalement situés sur les histones H3 et H4 et se traduit alors par une ouverture de la chromatine et une activation de la transcription. La méthylation des histones est beaucoup plus complexe car 2 types de résidus (arginine et lysine) peuvent être modifiés et ainsi avoir des effets variables. A titre d'exemple, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) marque les promoteurs des gènes actifs alors que la triméthylation de la lysine 9 (H3K9me3, présente au niveau de l'hétérochromatine) accompagne les gènes transcriptionnellement réprimés.

Les profils d'acétylation des histones sont gérés par des enzymes telles que l'acétyl-transférase (HAT) et des histones désacétylases (HDAC et Sirt). L'acétyl-CoA permet l'activité des HAT, le NAD<sup>+</sup> des HDAC et l'ATP permet la désacétylation des substrats chromatiniens par certaines HDAC. En fonction des conditions environnementales, par exemple lors d'un stress oxydatif, ces protéines se lient à la chromatine plus ou moins longtemps et influencent ainsi la transcription (Figure 5).



**Figure 5:** Modification des histones. L'acétylation (A) est catalysée par une histone acétyltransférase (HAT) et reversée par une histone désacétylase (HDAC); la méthylation (M) est catalysée par une histone méthyltransférase (HMTS) et reversée par une déméthylase (HDMs); et la phosphorylation (P) est catalysée par des protéine-kinases (PK) et reversée par des protéines phosphatases (PP) (Portha et al., 2014).

## b) Epigénétique et programmation fœtale

La méthylation ayant lieu très tôt au cours de la grossesse, des évènements environnementaux perçus par le fœtus peuvent induire des méthylations de l'ADN permanentes avec un impact à l'âge adulte. De plus en plus de travaux suggèrent que ces modifications épigénétiques sont à la base des processus physiopathologiques résultant de la programmation périnatale. Certains éléments sont capables d'influencer les

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

premiers stades de la vie, notamment une mauvaise alimentation maternelle ou post-natale, augmentant ainsi le risque d'obésité et d'autres maladies associées, comme le diabète ou les maladies cardiovasculaires, chez l'enfant.

Les souris Agouti ont été les premières utilisées afin de démontrer l'impact de la nutrition maternelle sur la méthylation de l'ADN et le phénotype du nouveau-né. La couleur du pelage des souris Agouti est déterminée par le gène «Agouti viable yellow» (Avy) dont l'expression est régulée par la méthylation de l'ADN. L'hypométhylation d'un élément transposable (le rétrotransposon) en amont du site d'initiation de la transcription du gène Avy est associée à son expression ainsi qu'à la couleur jaune du pelage. À l'inverse, un pelage de couleur brune est observé lorsque ce site est hyperméthylé et l'expression d'Avy réprimée (Duhl et al., 1994). Le gène Avy code pour la protéine Agouti, un facteur paracrine présentant, entre autre, la fonction d'antagoniste de Mc4r (Lu et al., 1994). Mc4r est un récepteur des mélanocortines dont le déficit est à l'origine d'un phénotype d'obésité sévère (Huszar et al., 1997). Par conséquent, les souris Agouti au pelage jaune, même si elles possèdent le même génome que celles au pelage brun, sont plus sujettes à l'obésité, au DT2 et au cancer (Miltenberger et al., 1997). Ces souris ont permis de démontrer que la supplémentation en donneur de groupement méthyl (acide folique, vitamine B12, bêtaïne et choline) pendant la gestation modifiait 1) les niveaux de méthylation du rétrotransposon, 2) l'expression d'Avy, et enfin 3) la couleur du pelage des souriceaux ainsi que leur degré d'obésité (Waterland and Jirtle, 2004). En cas de restriction protéique chez le rat, Bogdarina et coll ont montré une diminution de méthylation du gène codant le récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT1R) au niveau des glandes surrénales (Bogdarina et al., 2004). Cette hypométhylation s'accompagne d'une augmentation de l'expression du récepteur AT1b, et pourrait contribuer au phénotype d'hypertension retrouvé chez les descendants dans ce modèle (Plagemann et al., 2009). De plus, la restriction protéique au cours de la gestation modifie le degré de méthylation des îlots CpG situés au niveau des promoteurs des gènes codant pour PPAR $\alpha$  et pour le récepteur aux glucocorticoïdes dans le foie (Burdge et al., 2009), mais également des gènes clés du métabolisme énergétique (i.e. Adipoq, Igf2/H19, Lep, Ppara et Pomc) pour lesquels la méthylation de l'ADN est perturbée dans les tissus métaboliquement actifs (i.e. foie, hypothalamus, muscle et tissus adipeux) (Jousse et al., 2011; Khalyfa et al., 2013; Lillycrop et al., 2005, 2008; Plagemann et al., 2009). Les modèles de diabète maternel ont aussi permis de mettre en évidence un effet de l'hyperglycémie maternelle sur les niveaux de méthylation de certains gènes. Dans le modèle d'ovocytes de rates non diabétiques réimplantés chez des rates diabétiques, il a pu être démontré une transmission du diabète uniquement par l'environnement intra-utérin (Gill-Randall et al., 2004). L'hyperglycémie maternelle, selon sa sévérité, est responsable de variations importantes du développement pancréatique par modulation de l'expression d'IGF-2 et de facteurs de l'angiogenèse. Heijmans et son équipe ont été les premiers à suggérer que la méthylation de l'ADN pouvait être impliquée dans le phénomène de programmation fœtale (Heijmans et al., 2008). En effet, il ont montré que chez les personnes exposées *in utero* à la Famine Hollandaise de l'hiver 1944, le taux de méthylation d'IGF-2 était inférieur à celui de leurs frères et sœurs non exposés à cette famine ; il en était de même pour certains gènes associés à la croissance fœtale et au métabolisme énergétique

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



(i.e. ABCA1, GNASAS, IL10, LEP et MEG3) (Heijmans et al., 2008). L'hyperglycémie maternelle est également responsable de modifications de la voie Pdx1, facteur de transcription nécessaire pour le développement des cellules  $\beta$  du pancréas et la production d'insuline. En effet, en cas de diabète maternel, son expression, chez les rats, est réduite, induisant le développement d'un DT2 à l'âge adulte ; et il a été montré que la mise sous silence de Pdx1 est due à une diminution de l'acétylation des histones au niveau du promoteur proximal de Pdx1 (Park et al., 2008).

Les mécanismes responsables des modifications des niveaux de méthylation du fœtus exposés à l'hyperglycémie maternelle demeurent inexplorés mais des études *in vitro* suggèrent que l'hyperglycémie maternelle serait capable de moduler la méthylation de l'ADN via son action sur les DNMTs et les enzymes TET, plus particulièrement TET3 (Chiang et al., 2009; Zhang et al., 2014).

Enfin, l'exposition *in utero* à des conditions nutritionnelles délétères n'affecte pas simplement les descendants de la première génération mais peut également toucher les générations suivantes, même si celles-ci évoluent dans un environnement harmonieux. Les études épidémiologiques réalisées sur les descendants des femmes touchées par la famine Hollandaise de 1944, montrent des répercussions à long terme non seulement sur la santé de leurs enfants, mais également sur celle de leurs petits-enfants. En effet, les maladies cardiovasculaires et le DT2 peuvent être transmis aux petits-enfants dont les grands-parents ont été exposés à une dénutrition pendant leur enfance (Poston, 2011). La transmission à travers les générations semble s'effectuer via la lignée paternelle. En effet, la transmission à la 3<sup>ème</sup> génération pourrait venir d'une exposition des cellules germinales de la F1, qui aurait des répercussions sur plusieurs générations du fait des mécanismes épigénétiques (Ponzio et al., 2012).

## 2. Diabète maternel et programmation fœtale

De nombreuses conditions maternelles (alcool, anémie, tabac, drogue, malnutrition, gain de poids excessif pendant la grossesse, obésité ou diabète maternels) et environnementales (polluants) pouvant perturber le développement du fœtus sont aujourd'hui associées à la programmation de la santé métabolique du fœtus (Boney et al., 2005; Bunt et al., 2005; Galliano and Bellver, 2013; Minnes et al., 2011; O'Reilly and Reynolds, 2013; Silverman et al., 1991; Soto and Bahado-Singh, 2013). Il a également été mis en évidence que des facteurs environnementaux post-nataux tels que l'allaitement, l'alimentation et le stress jouent un rôle considérable dans la programmation de la santé métabolique du nouveau-né (Tamashiro and Moran, 2010) (Tableau 1).

### Exemples de conséquences de l'alimentation, du comportement maternel, ou de la croissance fœtale

#### Etudes chez l'homme

- Carence nutritionnelle maternelle: obésité, diabète, résistance à l'insuline, maladies coronariennes,

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

hypertension, insuffisance rénale, schizophrénie (Painter et al., 2005; Ravelli et al., 1998; de Rooij et al., 2006; Roseboom et al., 2000a, 2000b; Susser et al., 1996)

- Retard de croissance intra-utérin: hypertension, diabète, obésité, maladies cardiovasculaires, dysfonctionnement respiratoire, troubles neurologiques (Joss-Moore and Lane, 2009; Lahti et al., 2006; Varvarigou, 2010; Walther, 1988)
- Diminution du poids: résistance à l'insuline, obésité, symptômes comportementaux (hyperactivité, déficit de l'attention), maladies coronariennes, hypertension (Fan et al., 2010; Järvelin et al., 2004; Lahti et al., 2006; Lithell et al., 1996; Loaiza et al., 2011; Walther, 1988).

#### *Etudes chez l'animal*

- Restriction protéique ou calorique: augmentation de la pression artérielle, troubles de l'homéostasie du glucose, diminution de la sensibilité à l'insuline (Armitage et al., 2004)
- Insuffisance utéro-placentaire: retard de croissance intra utérine (RCIU)
- Suralimentation pré-ou néo-natale : prise rapide de poids de façon précoce, phénotype d'un syndrome métabolique (obésité, hyperleptinémie, hyperglycémie, hyperinsulinémie, rapport insuline/glucose élevé) (Plagemann et al., 2009)

### **Exemples de conséquences de l'exposition aux produits chimiques pendant la grossesse ou la petite enfance**

#### *Etudes chez l'homme*

- Tabagisme maternel: altération de la fertilité, obésité, hypertension, déficits neurocomportementaux (Gustafsson and Källén, 2011; Heinonen et al., 2011; Simonetti et al., 2011; Thiering et al., 2011)
- Arsenic (nord du Chili, 1958-1970) : cancer du poumon, altération des fonctions pulmonaires, infarctus du myocarde chez les nourrissons, augmentation de la mortalité cardiovasculaire chez les adultes (Dauphiné et al., 2011; Smith et al., 2006; Yuan et al., 2007)
- Diéthylstilbestrol (DES): cancer et malformations de l'appareil génital féminin; anomalies de l'appareil reproducteur mâle, un risque accru de cancer du sein au-delà de 40 ans (Adami et al., 2012; Rubin, 2007).

#### *Etudes chez l'animal*

- Arsenic: augmentation de la réponse cancéreuse à d'autres agents chez l'animal adulte (Tokar et al., 2011)
- Dexaméthasone: faible poids de naissance, hypertension, hyperglycémie, résistance à l'insuline, accroissement de la réponse au stress, obésité, différenciation prématurée des organes et tissus (Cleasby et al., 2003; O'Regan et al., 2008; Seckl and Meaney, 2004; Seckl et al., 2000)
- Diéthylstilbestrol (DES): obésité, diabète et anomalies de l'appareil reproducteur chez les souris femelles (Newbold et al., 2009).

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

## **Tableau 1:** Influence des facteurs environnementaux et maternels sur la santé au cours de la vie adulte.

Adapté de Boekelheide et coll (Boekelheide et al., 2012).

Dans le cadre de cette thèse, seule la programmation fœtale associée au diabète maternel sera abordée en détail.

### **2.1. Définition du diabète**

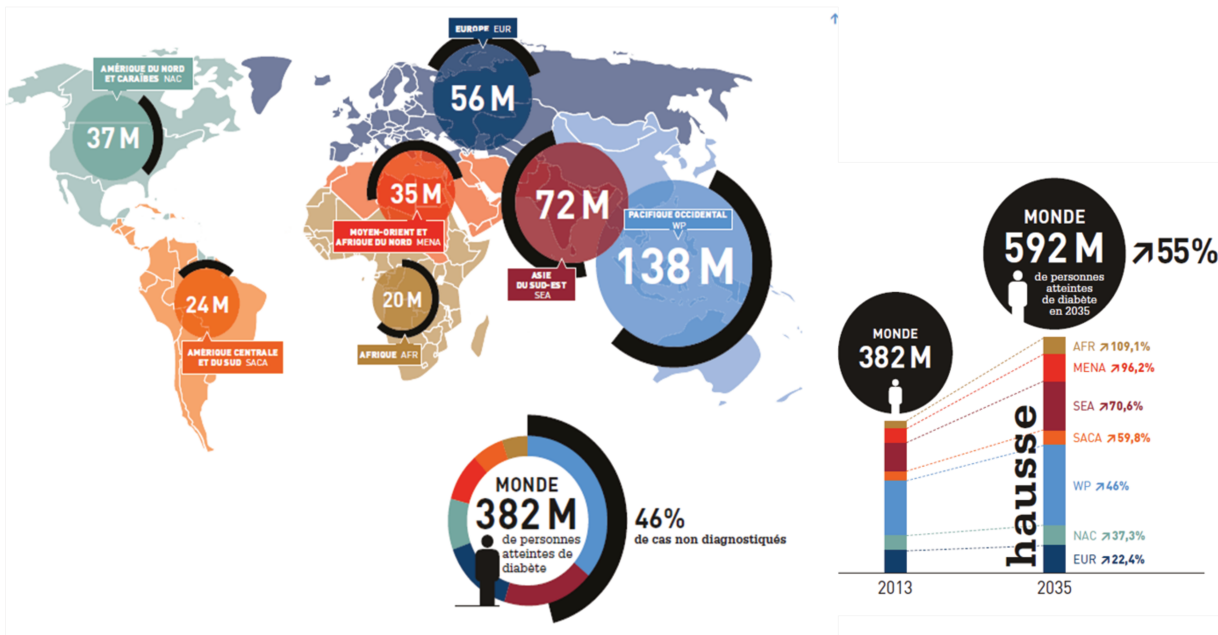
Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque l'organisme est incapable de produire suffisamment d'insuline ou d'utiliser l'insuline de manière efficace. Il existe 3 types de diabète :

- **le diabète de type 1** (DT1), appelé également diabète non insulino-résistant, est le résultat de la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans conduisant à une carence absolue en insuline.
- **le diabète de type 2** (ou diabète insulino-résistant) est le résultat d'un défaut de sécrétion d'insuline progressif sur fond de résistance à l'insuline.
- **le diabète gestationnel** (GDM) est la complication médicale la plus courante de la grossesse: un trouble de la tolérance au glucose conduit à une hyperglycémie de sévérité variable.

Une composante génétique (plus faible pour le DT1 que pour le DT2 et le GDM), en association avec les facteurs environnementaux, intervient dans le développement de ces 3 types de diabète, notamment le gène Rfx6 qui joue un rôle clé dans la formation des cellules productrices d'insuline (rôle primordial dans plusieurs étapes indispensables à la sécrétion d'insuline en fonction des fluctuations de la glycémie) ou Pdx1 (facteur de transcription nécessaire pour le développement des cellules  $\beta$  du pancréas et la production d'insuline).

### **2.2. Données épidémiologiques**

L'incidence du diabète (DT1 et DT2) est en constante augmentation, atteignant des proportions épidémiques. Le DT2 représente 90% des diabètes rencontrés dans les pays industrialisés comme ceux en cours de développement, ce qui pose un défi de taille pour la santé humaine. En effet, les dernières estimations de la Fédération Internationale du Diabète indiquent que 382 millions de personnes (8,3% de la population mondiale) sont atteintes de diabète ; et ce nombre est supposé dépasser les 592 millions dans moins de 25 ans (Figure 6).



**Figure 6:** Répartition mondiale du nombre de personnes atteintes de diabète d'après la Fédération Internationale du Diabète (FID) en 2013.

Mais si cette pathologie touche plus généralement les adultes, l'âge d'apparition du DT2 diminue régulièrement, aboutissant à l'augmentation du nombre d'enfants et d'adolescents atteints (Song and Hardisty, 2008). L'incidence croissante de l'obésité en est l'une des explications (Shaw, 2007). Associé à l'obésité, le DT2 est caractérisé principalement par une résistance à l'insuline et plusieurs changements métaboliques dont une hyperinsulinémie, une hyperglycémie, une dyslipidémie et le développement d'une hypertension artérielle, aboutissant à long terme à un risque accru de survenue d'événements cardiovasculaires (Goldstein, 2002). En France, 1 personne sur 700 souffre de diabète. En 2014, 9% de la population adulte (18 ans et plus) était diabétique. En 2012, le diabète a été la cause directe de 1,5 million de décès. Cette épidémie d'obésité et de DT2 augmente la probabilité de diabète chez la femme enceinte. Les estimations suggèrent que 30 millions de femmes en âge de procréer souffriront de diabète d'ici 2030 (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1993).

Les données des certificats de naissance montrent que le diabète maternel complique environ 3% des grossesses (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1993). En effet, en cas de diabète maternel, le fœtus en développement est exposé à un environnement intra-utérin hyperglycémique, conférant aux nourrissons un risque accru d'événements périnataux indésirables tels qu'une augmentation du taux d'anomalies congénitales, d'avortements spontanés, de modifications de la croissance fœtale ou de décès néonataux (Ballas et al., 2012; Boney et al., 2005; Casson et al., 1997; Jensen et al., 2004). Mais récemment, des complications à plus long terme ont été décrites. Une étude réalisée en 2003 a montré que les nourrissons nés de mères ayant une légère intolérance au glucose pendant la grossesse avaient 20% de masse grasse en plus par rapport à des enfants nés de femmes ayant une tolérance au glucose normale ; ces données sont

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

évocatrices d'une altération précoce du métabolisme des graisses chez les descendants suite à l'exposition prénatale d'une augmentation de la concentration en glucose maternelle (Catalano et al., 2003). D'autre part, dans une étude prospective aux Etats-Unis, il a été montré que la prévalence des troubles de la tolérance au glucose chez les descendants de mères diabétiques, âgés de 10 à 16 ans, est six fois plus élevée que celle des contrôles (Silverman et al., 1995) et les enfants nés de mères diabétiques ont un indice de masse corporelle (IMC) plus élevé que les individus contrôles (Silverman et al., 1995, 1998). Aussi, le diabète au cours de la grossesse prédispose les descendants au développement d'une obésité et d'une intolérance au glucose plus tard dans leur vie, et ceci de façon indépendante d'une transmission génétique.

Afin de reproduire et d'étudier les effets à long terme du diabète maternel sur les descendants, des modèles animaux ont été mis au point. Ces modèles permettent d'évaluer les réponses aux modifications de l'environnement intra-utérin, sans intervention des caractères héréditaires connus du diabète (Gauguier et al., 1990).

### 2.3. Modèles expérimentaux de diabète maternel

Le modèle qui pourrait reproduire le mieux le diabète gestationnel est une perfusion maternelle de glucose au cours de la gestation. Malheureusement, il a été montré que ce modèle ne reproduisait pas la carence en insuline maternelle retrouvée en cas de diabète maternel (Gauguier et al., 1990; Ktorza et al., 1981).

Par la suite, les modèles ont été induits chimiquement. Le modèle le mieux caractérisé à l'heure actuelle est le modèle réalisé par injection de streptozotocine (2-deoxy-2-(3-méthyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose ( $C_8H_{15}N_3O_7$ ), STZ) (Ward, Yau et al., 2001). La streptozotocine, dérivée de *Streptomyces Achromogenes*, a été isolée en 1956 sous la forme d'un nouvel antibiotique possédant une action antimicrobienne à large spectre. Par la suite, des études chez le chien et le singe Rhésus ont démontré une haute toxicité de la STZ avec un pouvoir diabétogène puissant (Carter et al., 1971).

#### 2.3.1. Modèles expérimentaux induits par la streptozotocine

Depuis le rapport initial de ses propriétés diabétogènes, la STZ a été utilisée seule ou en combinaison avec d'autres produits chimiques pour l'induction du DT1 ou du DT2 (Gajdosík et al., 1999; Ghasemi et al., 2014). Ainsi, il est possible d'induire un DT1 chez le rongeur par une simple injection de STZ (Junod et al., 1969; Yin et al., 2006). Quant au DT2, il peut être induit (i) soit par injection de STZ après administration de nicotinamide (Szkudelski, 2012; Wu et al., 2008), (ii) soit par un régime alimentaire riche en graisse associé à une injection de STZ à faible dose (Skovsø, 2014) ou (iii) par une injection de STZ pendant la période néonatale (Patil et al., 2014; Portha et al., 2014). L'utilisation de ces modèles a permis d'élucider les mécanismes de la pathogenèse diabétique mais également de détecter des produits naturels ou artificiels potentiellement capables d'abaisser le niveau de glycémie (Kumar et al., 2012; Srinivasan et al., 2005).

### 2.3.2. Mécanismes d'action de la streptozotocine

Cette toxine d'origine naturelle a une structure proche d'un agent alkylant de l'ADN. Elle contient une molécule de glucose, sous forme de 2-deoxyglucose, liée à un fragment N-méthyl-N-nitrosourée hautement réactif et tératogène (Figure 7A) conférant ses effets cytotoxiques à la STZ (Johansson and Tjalve, 1978). Grâce à sa molécule de glucose, la STZ est captée par le transporteur GLUT2, abondant au niveau des membranes plasmiques des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Une fois rentrée dans la cellule, la STZ provoque la cassure des brins d'ADN au sein des îlots pancréatiques, entraînant la mise en place de mécanismes de défense qui font intervenir la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) chargée d'éliminer les cassures ou les bases endommagées. La STZ active en parallèle la voie des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui induisent également des dommages à l'ADN, entraînant la mise en place des mécanismes de réparation par la PARP. La suractivation de cette enzyme va aboutir à l'épuisement des niveaux de  $\text{NAD}^+$  intracellulaire et d'ATP, conduisant à la mort cellulaire par alkylation de l'ADN (Delaney et al., 1995) (Figure 7B). La destruction des cellules  $\beta$  provoque alors une hyperglycémie, une hypo-insulinémie, une polyurie, et une perte de poids de l'animal (Dall'Ago et al., 2002). L'administration de STZ à des femelles gestantes aboutit donc au développement d'un diabète insulino-dépendant, beaucoup plus proche du DT1 que du DT2 ou du GDM.

Les modèles impliquant la STZ ont souvent été décriés puisque la STZ pouvait avoir une action sur de nombreux organes. En effet le transporteur GLUT2 existant également, dans une moindre mesure, dans le foie et les reins, certaines doses élevées de STZ pourraient nuire aux fonctions hépatiques et rénales (Bauwens and Roman, 2005). Lors de l'administration, la STZ est rapidement métabolisée par le foie et éliminée par excrétion rénale (Karunanayake et al., 1974) faisant que sa demi-vie n'excède pas 15 minutes (Eleazu et al., 2013). Aussi sa toxicité aiguë pour le foie et le rein peut être négligée (Tesch and Allen, 2007) et les pertes de fonctions rénale ou hépatique en cas de traitement à la STZ doivent être attribuées aux effets de l'hyperglycémie plutôt qu'à la toxine elle-même (Wei et al., 2003).

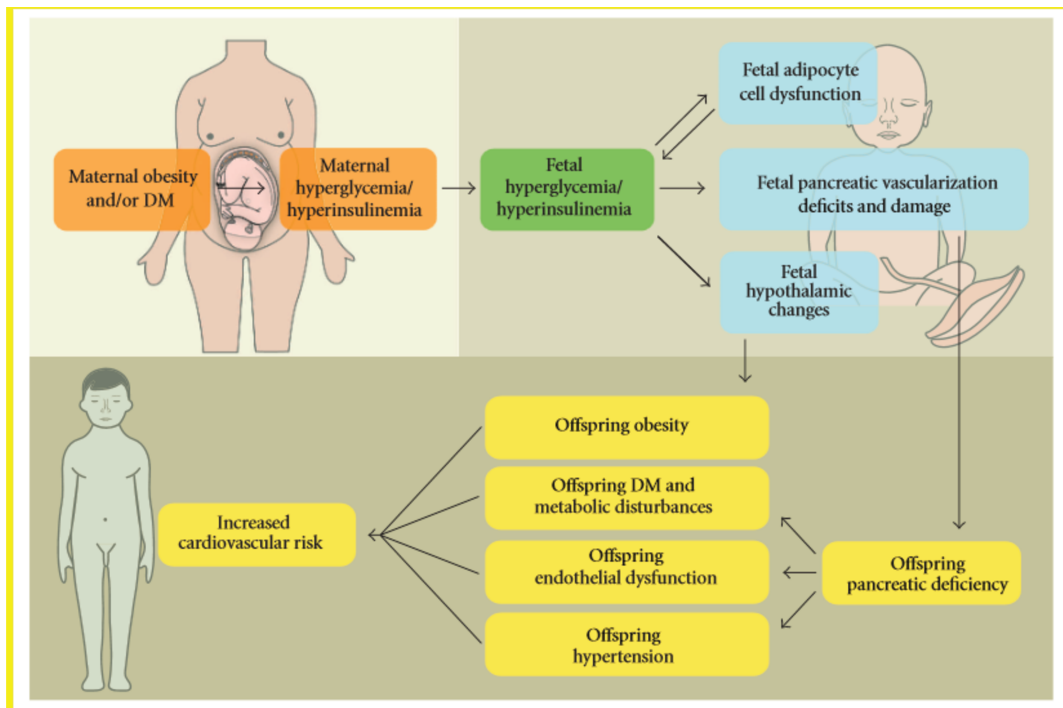


principale hormone de croissance pour le fœtus est l'insuline sécrétée par ses propres cellules  $\beta$ , responsable de 50% du poids fœtal (Fowden, 1992). En cas de diabète maternel modéré, l'hyperglycémie maternelle stimule le pancréas fœtal provoquant ainsi une hyperplasie des îlots et une hyperactivité des cellules  $\beta$  qui conduit à une hyperinsulinémie. L'insuline fœtale stimule alors non seulement la production de facteurs de croissance IGFs mais entraîne également une augmentation de l'absorption du glucose et des acides aminés conduisant à une macrosomie fœtale. Dans les cas de diabète maternel important, la stimulation excessive des cellules  $\beta$  fœtales par l'hyperglycémie maternelle aboutit à leur épuisement, les rendant ainsi incapable de sécréter l'insuline ; ceci conduit donc à une hypoinsulinémie fœtale associée à une réduction du nombre des récepteurs de l'insuline sur les cellules cibles, aboutissant à une réduction de l'absorption de glucose fœtal et donc à une hypotrophie fœtale (Van Assche et al., 2001).

## 2.4. La programmation fœtale des maladies cardiovasculaires

Alors que beaucoup d'études portent sur les altérations métaboliques des descendants suite à un environnement intra-utérin perturbé, des altérations cardiovasculaires, et notamment l'hypertension artérielle, sont également des conséquences à long terme. Alors que l'obésité et le diabète sont connus pour augmenter le risque de maladies cardiovasculaires, peu d'études ont examiné l'effet d'un environnement intra-utérin hyperglycémique sur les facteurs de risque cardiovasculaire chez la descendance. Pourtant, des changements cardiovasculaires sont déjà perceptibles chez le fœtus dès le troisième trimestre de grossesse d'une mère diabétique. En effet, le rythme cardiaque fœtal montre une contractilité ventriculaire réduite, suggérant que l'environnement intra-utérin diabétique induit des altérations biochimiques qui affectent la fonction du système cardiovasculaire (Räsänen and Kirkinen, 1987). Il a été suggéré que l'exposition à un environnement intra-utérin hyperglycémique est associée à une augmentation de la dyslipidémie, de l'inflammation vasculaire, et à une dysfonction endothéliale chez les enfants (Manderson et al., 2002); ces perturbations pourraient être en lien avec le développement de maladies cardiovasculaires au cours de la vie adulte. Par la suite, d'autres études ont montré que les enfants nés de parents diabétiques étaient plus souvent atteints de pathologies cardiovasculaires et d'hypertension artérielle (HTA) (Torrens et al., 2009; Wroblewska-Seniuk et al., 2009) (Figure 8).





**Figure 8:** Influence de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie maternelles sur le développement fœtal et post-natal. L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie maternelles agissent sur les fonctions du métabolisme fœtal, y compris sur l'hypothalamus, le pancréas et le tissu adipeux. Ces perturbations métaboliques pourraient augmenter le risque cardiovasculaire chez le jeune adulte (Vrachnis et al., 2012).

Nombreuses études suggèrent que l'hypertension artérielle (HTA), l'un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, trouve son origine au cours de la vie intra-utérine. Des études cliniques montrent que les enfants nés de mères ayant eu une intolérance au glucose au cours de leur grossesse ont une pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) plus élevée que celles des enfants témoins, dès l'âge de 8 ans (Tam et al., 2010). Les données obtenues chez les indiens Pima ont révélé que les enfants nés de mères atteintes de diabète pendant la grossesse avaient, à l'adolescence, une pression artérielle systolique (PAS) supérieure à celle des enfants nés de mères atteintes de diabète après la grossesse et ceci indépendamment de l'obésité (Bunt et al., 2005). Cette augmentation de la PAS, observée à un âge moyen de 10-14 ans, a également été retrouvée dans une cohorte d'enfants nés de mères diabétiques à Chicago (Silverman et al., 1991). Cette relation entre diabète maternel et élévation de la pression artérielle au cours de la petite enfance et de l'adolescence a été confirmée dans de nombreuses autres études (Aceti et al., 2012; Silverman et al., 1991).

Malgré tout, les mécanismes de la programmation précoce de l'HTA semblent complexes (Boubred et al., 2007) ; c'est le résultat d'une combinaison de différents mécanismes agissant au niveau des organes, des tissus et des cellules. Les organes tels que le rein et/ou le système vasculaire sont plus à risque puisque leur développement n'est achevé qu'en fin de gestation ou quelques jours après la naissance. Ainsi les connaissances actuelles sont largement confinées aux mécanismes rénaux et vasculaires.

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

### 2.4.1. Diabète maternel, développement rénal et hypertension artérielle

Le rein est un organe central dans la physiopathologie de l'HTA. Plusieurs sources, aussi bien cliniques qu'expérimentales, indiquent que les changements dans l'environnement du fœtus peuvent affecter le développement rénal (Merlet-Bénichou, 1999) et notamment que l'exposition *in utero* à l'hyperglycémie maternelle peut perturber son développement (Hokke et al., 2013). En effet, une exposition prolongée du fœtus à une concentration élevée de glucose peut entraîner une embryopathie diabétique qui se caractérise par une multitude de malformations y compris du système rénal (Becerra et al., 1990; Chugh et al., 2003). Les études *in vitro* ont pu mettre en évidence une dysmorphogénèse rénale embryonnaire en présence de concentrations élevées de D-glucose (Kanwar et al., 1996). Chez l'animal, une hyperglycémie modérée induite par une perfusion continue de glucose durant 4 jours ou par une injection de STZ chez des rates gestantes induit un déficit permanent de néphrons dans la descendance (Amri et al., 1999; Lelièvre-Pégorier et al., 1998). Malgré tout, le moment de l'injection ou la dose utilisée semblent avoir des effets contradictoires ; Rocha et coll ont montré qu'une simple injection de STZ réalisée chez la femelle avant l'accouplement entraînait des perturbations de la fonction rénale sans modification du nombre de néphrons chez le jeune rat adulte (Rocha et al., 2005). D'autres études mettent en cause l'activation des mécanismes d'apoptose, du système rénine-angiotensine (SRA) rénal et de la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B dans la dysmorphogénèse rénale observée (Tran et al., 2008), ainsi qu'une expression accrue du facteur de croissance insulino-mimétique de type 2 (IGF-2) (Amri et al., 2001) en cas d'exposition *in utero* au diabète maternel. Le risque d'agénésie ou de dysgénésie rénale augmente ainsi considérablement chez les enfants nés de mères diabétiques (Davis et al., 2010; Hokke et al., 2013). Abi Khalil et coll ont pu observer que le taux de filtration glomérulaire ainsi que le débit plasmatique rénal étaient altérés chez les descendants nés de mères souffrant de DT1, ce qui pouvait refléter une diminution du nombre de néphrons entraînant une hyperfiltration glomérulaire (Abi Khalil et al., 2010). En effet, la réduction néphronique est connue pour augmenter le taux de filtration glomérulaire, suivi par une hypertension glomérulaire, d'une protéinurie, de l'activation du système rénine-angiotensine rénal et au final de la destruction des néphrons fonctionnels par glomérulosclérose. Brenner et coll ont été les premiers à suggérer un lien entre nombre de néphrons et développement de l'hypertension artérielle, résultant d'une rétention rénale de sodium inappropriée (Brenner et al., 1988). En effet, au niveau expérimental, les rats exposés *in utero* à une hyperglycémie maternelle modérée avaient une clairance de la créatinine plus élevée et une excrétion urinaire de N-acétyl-bD-glucosaminidase plus grandes, indiquant un stade précoce d'une néphropathie (Yan, Li et al. 2014). Chez l'homme, l'augmentation de l'excrétion urinaire d'albumine observée chez les descendants adultes des mères indiennes Pima souffrant de diabète, suggère une apparition précoce de lésions glomérulaires qui pourraient être expliquées par un mécanisme similaire de réduction néphronique (Nelson et al., 1998).

Pourtant, si le lien entre réduction néphronique, glomérulosclérose et HTA semble bien admis, des études montrent que cela ne serait pas la seule cause dans le développement de l'HTA au cours de la vie adulte. En effet, Nehiri et coll ont montré que, suite à l'exposition *in utero* au diabète maternel, malgré une réduction du

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

nombre de néphrons d'environ 30% dès la naissance et de l'apparition d'une HTA aux alentours de 6 mois, les rats ne développaient aucune glomérulosclérose à un âge tardif (18 et 24 mois) (Nehiri et al., 2008); ces résultats indiquent que l'HTA programmée *in utero* pourrait être multifactorielle.

#### 2.4.2. Diabète maternel, fonction vasculaire et hypertension artérielle

Indépendamment du mécanisme rénal, l'HTA pourrait être en partie due à une programmation fœtale entraînant une altération de la structure et/ou de la fonction vasculaire. Des examens de l'aorte par ultrasons ainsi que des études post-mortem chez le fœtus et le nourrisson suggèrent que les facteurs périnataux tels que l'hypercholestérolémie maternelle ou le diabète maternel sont associés à des altérations pouvant refléter une athérosclérose précoce (Skilton, 2008). De nombreuses études montrent que les descendants de mères diabétiques sont à très fort risque cardiovasculaire, avec une augmentation de leurs niveaux circulants de molécules d'adhésion, biomarqueurs endothéliaux de perturbations délétères liés aux premiers stades de la maladie vasculaire (West et al., 2011). Cette dysfonction endothéliale pourrait ainsi être une nouvelle porte d'entrée au développement de l'HTA à l'âge adulte, tout comme la raréfaction capillaire associée à des résistances vasculaires accrues (Taddei et al., 1992).

##### a) Les vaisseaux de conductance (aorte)

La teneur en élastine de la matrice extracellulaire est un facteur important de compliance artérielle (capacité des gros vaisseaux à amortir la pulsativité cardiaque) et intervient donc dans la régulation du niveau de pression artérielle. Or l'élastine est synthétisée et s'accumule dans les artères essentiellement au cours de la vie fœtale et périnatale ; ainsi un contenu initial en élastine insuffisant suite à un retard de croissance intra-utérin en réponse au diabète maternel peut être un facteur important dans la programmation de développement de l'hypertension (Martyn and Greenwald, 1997). D'autre part, Ingram et coll ont montré que, chez les descendants de mères diabétiques, les cellules endothéliales présentaient des fonctions angiogéniques modifiées (prolifération réduite et sénescence accélérée) en lien avec les concentrations élevées de glucose maternel (Ingram et al., 2008). Enfin, les marqueurs circulants de la fonction endothéliale (VCAM-1, ICAM-1 ou la Sélectine E), indicateurs de risque cardiovasculaire, ont été trouvés augmentés chez les descendants de mères diabétiques (Manderson et al., 2002).

Un autre aspect de la dysfonction endothéliale est l'altération de sa fonction vasodilatatrice. L'endothélium est impliqué dans un certain nombre de fonctions vasodilatatrices par sa capacité à générer des médiateurs vasoactifs agissant localement tels que le monoxyde d'azote (NO) ou les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>). Chez les rats issus de mères diabétiques, la production de NO dans des segments d'aorte isolée est diminuée de manière significative (Cavanal et al., 2007). Cette diminution de production de NO pourrait expliquer la baisse de réactivité vasculaire en réponse à l'acétylcholine (ACh) observée sur les anneaux aortiques de rats issus de mères diabétiques (Porto et al., 2010). Si la voie du NO semble majoritairement perturbée par le diabète maternel, plus récemment les travaux menés par l'équipe du Dr Fassot ont mis en évidence des perturbations plus profondes touchant également la voie des prostacyclines ou du métabolisme de l'acide arachidonique,

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

principale voie de production de l'acide 20-HETE, puissant vasoconstricteur. En effet, l'étude du profil d'expression génique de l'aorte chez des rats issus de mères diabétiques a mis en évidence une sur-expression de plusieurs acteurs du métabolisme de l'acide arachidonique, ainsi qu'une sous-expression du récepteur de la prostacycline, semblant dessiner un profil plutôt vasoconstricteur (Duong Van Huyen et al., 2010).

### **b) Les vaisseaux de résistance (artère mésentérique)**

Globalement, quelque soit le modèle d'induction de diabète utilisé, l'exposition *in utero* au diabète maternel induit des perturbations de la réactivité des artères mésentériques équivalente à celles observées dans les aortes, à savoir une exacerbation des voies contractiles et un affaiblissement des voies vasodilatatrices. Très tôt, il a été mis en évidence que les artères mésentériques de descendants adultes de mères diabétiques avaient une sensibilité accrue à la noradrénaline et une relaxation endothélium-dépendante anormale à l'ACh et à la bradykinine (Holemans et al., 1999). Cette dysfonction endothéliale semble perdurer puisque chez des animaux âgés, il est encore observé une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante, alors que la réponse au SNP est conservée (Rocha et al., 2005). D'autres études ont également mis en évidence une part plus importante des dérivés des prostanoïdes (issus des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2) dans la contraction à la noradrénaline, dans l'augmentation des résistances vasculaires et de la pression artérielle chez les animaux issus de mères diabétiques. En effet, l'altération de relaxation observée en réponse à l'ACh chez les animaux issus de mères diabétiques est restaurée par l'inhibition de COX-2. Cet effet joue un rôle clé dans la pathogenèse de la dysfonction endothéliale, ce qui en retour pourrait contribuer à la progression du dysfonctionnement vasculaire chez ces rats (Ramos-Alves et al., 2012).

Ainsi, le système vasculaire étant décrit comme fortement impliqué dans ces phénomènes de programmation en réponse au diabète maternel, en particulier des altérations de la fonction vasculaire (Duong Van Huyen et al., 2010; Holemans et al., 1999; Manderson et al., 2002; Vessières et al., 2016), une étude plus approfondie de cette fonction vasculaire est nécessaire. Aussi, dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à la structure et la fonction vasculaire. Le tonus et le remodelage vasculaire en réponse aux différents stimuli seront abordés en détail.

## Chapitre 2 : Système vasculaire

L'appareil cardiovasculaire assure la circulation du sang et permet le transport de l'oxygène et des nutriments vers les cellules ; il permet également d'évacuer les déchets afin de maintenir le métabolisme général de l'organisme. Le système cardiovasculaire est composé d'une double pompe : le «cœur gauche» qui assure la circulation systémique et permet la distribution des nutriments et de l'oxygène (O<sub>2</sub>) aux différents organes, excepté les poumons, et le «cœur droit» qui assure la circulation pulmonaire permettant au sang d'être re-oxygéné au contact des alvéoles pulmonaires et débarrassé du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Ce système est complété par un réseau de distribution à haute pression (les artères), se terminant par des vaisseaux à résistance variable (les artérioles), puis d'un circuit de petits vaisseaux au niveau desquels s'effectuent les échanges (les capillaires), et enfin d'un circuit de retour à basse pression vers le cœur (les veines). On retrouve également une circulation lymphatique, les vaisseaux lymphatiques constituant un système de drainage parallèle au système veineux. La principale fonction du système lymphatique est l'élimination des protéines et des autres substances qui ne peuvent pas être absorbées par les capillaires veineux à partir de l'espace intercellulaire.

Mais la circulation sanguine possède également d'autres fonctions, toutes aussi importantes :

- **une fonction de mise en relation** : l'appareil circulatoire transporte non seulement des molécules chimiques informatives (médiateurs) mais également des cellules spécialisées dans les communications entre populations cellulaires (les cellules immunitaires). D'autre part, il intervient dans le maintien de la forme des organes (hydrosquelette),
- **une fonction de reproduction** : il s'agit d'un travail d'alimentation vers le fœtus au cours de la grossesse et d'un rôle dans des mécanismes de la vie sexuelle.

### 1. Description du système vasculaire

Les différents types d'artères sont constitués de 3 tuniques concentriques (Figure 9) :

- **l'intima ou tunique interne** est la couche la plus mince de la paroi artérielle. Elle est constituée successivement :
  - d'une couche de cellules endothéliales directement au contact du sang
  - de la membrane basale (qui est une matrice extracellulaire constituée de laminine, de collagène de type IV et VII, ainsi que de glycosaminoglycanes, et de fibres de réticuline en réseau)
  - de la sous-couche endothéliale (avec une matrice extracellulaire composée de protéoglycanes et de glycoprotéines de structure et du collagène de type III et IV).
- **la média ou tunique moyenne** est la couche principale de l'artère. Elle est délimitée par les limitantes élastiques interne et externe, épaisses lames d'élastine percées de fenestrations. Ces ouvertures sont

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

suffisamment larges pour permettre le passage bidirectionnel de substances et de cellules. La média est formée par un empilement concentrique d'unités composées de cellules musculaires lisses (CMVLs) et d'une matrice conjonctive (élastine, collagène et mucopolysaccharides). Selon la proportion relative des constituants de cette matrice, deux grands types d'artères sont ainsi distingués : (1) **les artères élastiques** ou **artères de conductance** (aorte, gros troncs artériels supra-aortiques, carotides, artères iliaques) possédant une média riche en fibres élastiques qui assurent les propriétés de compliance artérielle (fonction d'amortissement de la pulsativité cardiaque), (2) **les artères musculaires** ou artères de résistance (artères mésentériques, coronaires, tibiales, brachiales, artérioles) où la faible présence de fibres élastiques est le déterminant principal et la forte proportion de CMVLs assure les propriétés vasomotrices de ce type de vaisseaux.

- **l'adventice ou tunique externe** est composée d'un tissu conjonctif simple. Elle repose sur la lame élastique externe qui délimite cette tunique de la média. Elle contient des fibroblastes, des cellules adipeuses et les vasa vasorum. Le rôle nourricier des vasa vasorum est restreint à la partie externe de la média. En effet celle-ci est avasculaire tant que son épaisseur n'atteint pas une trentaine d'unités lamellaires.

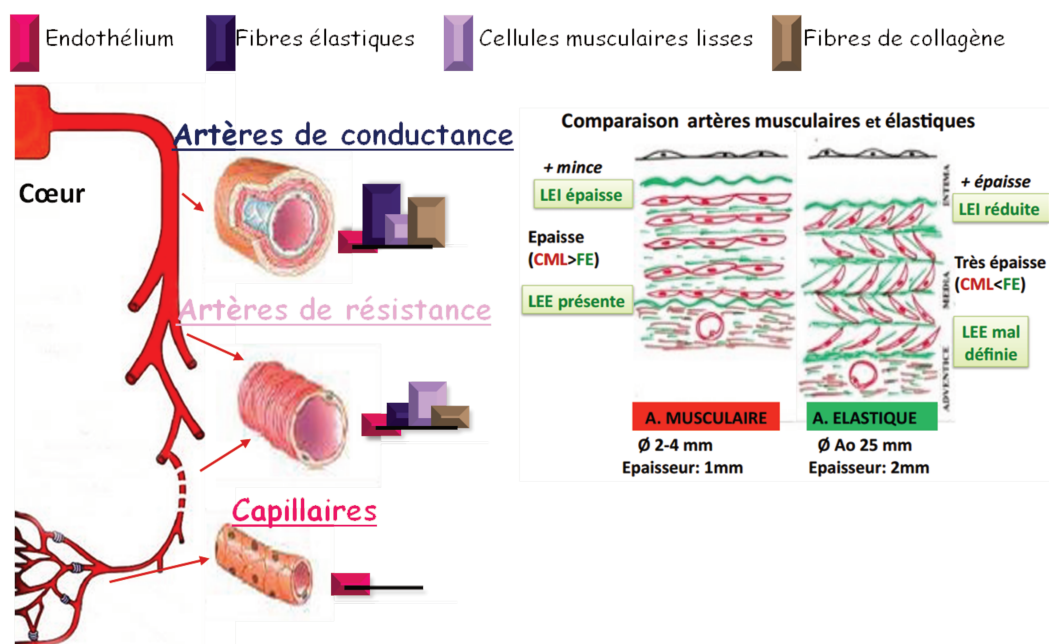


Figure 9: Composition de l'arbre vasculaire avec ses différents types de vaisseaux.

## 2. Physiologie et mécanique du système vasculaire

### 2.1. Physiologie

**Les artères élastiques** de gros calibre servent de conduits à faible résistance pour transporter le sang du cœur aux artères de taille moyenne ; les fibres élastiques représentent 40% de la composition totale de la

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

paroi vasculaire. Pendant la systole ventriculaire, ces artères riches en fibres élastiques se déforment, se dilatent et une partie de l'énergie est emmagasinée dans cet étirement. Pendant la diastole, l'artère reprend son diamètre initial et l'énergie est restituée, ce qui permet de maintenir la pression et donc l'écoulement continu de sang. L'élasticité de ces artères permet d'amortir les fluctuations de pression entre la diastole et la systole. Ainsi, ces artères modulent la pression pulsée et jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la pression et du flux sanguin. Les artères élastiques sont les premiers vaisseaux à subir et à amortir les forces de pression dues aux contractions cardiaques car ceux sont les plus proches du cœur. Ce sont donc les vaisseaux les plus distensibles et les plus compliants (capacité d'un vaisseau à augmenter son volume par unité d'augmentation de pression artérielle).

Les **artères musculaires** offrent une résistance à l'écoulement du sang. Elles représentent le site principal de résistance dans le système vasculaire et peuvent avoir un grand impact sur la perfusion de tissu et la pression artérielle. Elles adaptent leur débit au besoin des organes cibles et permettent une régulation très fine des débits sanguins locaux grâce à leur capacité de moduler leur tonus en fonction de la pression, du débit et des besoins tissulaires (stimuli neuronaux et hormonaux).

En effet, le débit obéit à la loi de Poiseuille :

$$Q = \Delta P / R$$

Q étant le débit volumique et  $\Delta P$  la différence de pression amont-aval dans le vaisseau

Selon la loi de Poiseuille (écoulement laminaire),

$$R = 8\eta L / \pi r^4$$

R étant le rayon du vaisseau,  $\eta$  la viscosité du sang et L la longueur du vaisseau

Ainsi, ces artères, riche en fibres musculaires lisses (artères mésentériques) permettent le contrôle du débit sanguin en se contractant (diminution du diamètre de l'artère en réponse à la pression : **tonus myogénique**) ou en se relâchant (augmentation du diamètre de l'artère en réponse au flux : **dilatation flux-dépendante**). A l'état basal, le tonus vasculaire de ces artères résulte de l'interaction entre tonus myogénique et sympathique d'une part et dilatation due au flux d'autre part. Le tonus myogénique désigne la capacité d'un vaisseau à diminuer activement son diamètre, par contraction de ses CMVLs, en réponse à une augmentation de la pression intraluminale (Davis and Hill, 1999; Levy et al., 2001). Ce tonus est indépendant de toute stimulation nerveuse ou hormonale (Davis and Hill, 1999) et gagne de l'importance avec la diminution du calibre des vaisseaux, atteignant son maximum au niveau des petites artères et des artérioles où il peut aller jusqu'à occasionner une fermeture totale du vaisseau (Davis, 1993b). Ce tonus joue un rôle protecteur pour les capillaires situés en aval contre une augmentation de la pression en amont. A l'inverse, la dilatation flux-dépendante implique l'activation des cellules endothéliales suite à une augmentation des forces de cisaillement (« shear stress ») suite à l'augmentation du flux sanguin. En réponse, les cellules endothéliales secrètent des agents vasodilatateurs entraînant le relâchement des CMVLs sous-jacentes.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



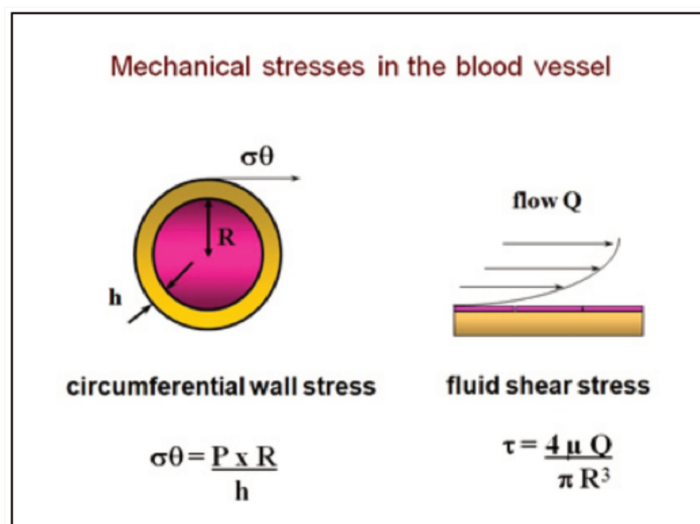
**Les artérioles** ont un calibre fin et leur structure histologique est considérablement simplifiée. Elles représentent le segment vasculaire où la chute de pression est la plus importante. Au niveau des capillaires, la pression est d'environ 20 mmHg alors qu'en amont des artérioles elle est de 80 mmHg. Il est classique de distinguer : 1) les métartérioles qui possèdent encore une lame élastique interne et où la média contient plusieurs assises de fibres lisses et 2) les artérioles proprement dites composées d'une intima qui comprend l'endothélium et la lame basale, sans lames élastiques interne ou externe (le tissu conjonctif sous-endothélial est réduit à sa plus simple expression), une média constituée d'une seule assise de fibres musculaires lisses disposées concentriquement autour de la lumière et d'un adventice de faible épaisseur, ne contenant pas de vasa vasorum.

Chaque artériole débouche sur un réseau de capillaires précédés de renforcements focaux des fibres lisses constituant les sphincters pré-capillaires.

**Les capillaires** sont les vaisseaux les plus fins de l'organisme. Ils sont disposés en réseaux enchevêtrés au sein même des organes. Ils ne contiennent quasiment que des cellules endothéliales dont le but est l'échange avec les organes. On estime à 700 m<sup>2</sup> environ la surface totale d'échange chez un sujet adulte normal. Le débit dans un capillaire donné peut subir d'importantes variations pour s'adapter aux besoins.

Les vaisseaux sont constamment soumis à des contraintes mécaniques: (1) **les contraintes pariétales** ou stress circonférentiel ( $\sigma_\theta$ ) agissant tangentiellement sur la paroi et liées directement à la pression et aux dimensions du vaisseau (diamètre, épaisseur); et (2) **les contraintes de cisaillement** ( $\tau$ ) agissant dans la direction longitudinale, à l'interface sang-endothélium, et liées directement au profil de vitesse de l'écoulement. La contrainte pariétale est définie par la formule  $\sigma_\theta = P \times r / h$  (h étant l'épaisseur de la paroi). Les contraintes de cisaillement dépendent du débit (Q) et de la viscosité ( $\mu$ ) du fluide, et sont inversement proportionnelles au cube du rayon du vaisseau (Figure 10).





**Figure 10:** Différence entre contrainte pariétale et contrainte de cisaillement (Kwak et al., 2014; Malek et al., 1999).

Ces contraintes interviennent non seulement dans le contrôle de la vasomotricité, mais aussi dans la croissance et le développement physiologiques des vaisseaux. Toute altération des contraintes mécaniques s'accompagne d'un processus d'adaptation au nouvel environnement hémodynamique, conduisant à terme au remaniement de la paroi vasculaire (remodelage, cf paragraphe 4.3.).

## 2.2. Mécanique

### 2.2.1. Endothélium et réactivité vasculaire

Longtemps perçu comme une structure inerte, l'endothélium est aujourd'hui considéré comme un organe dynamique ayant des fonctions cruciales telles que les échanges sang/tissu, un rôle anti-inflammatoire, anticoagulant ou antiagrégant autant dans un contexte physiologique que pathologique (Bunting et al., 1976; Furchgott and Zawadzki, 1980) (Tableau 2).

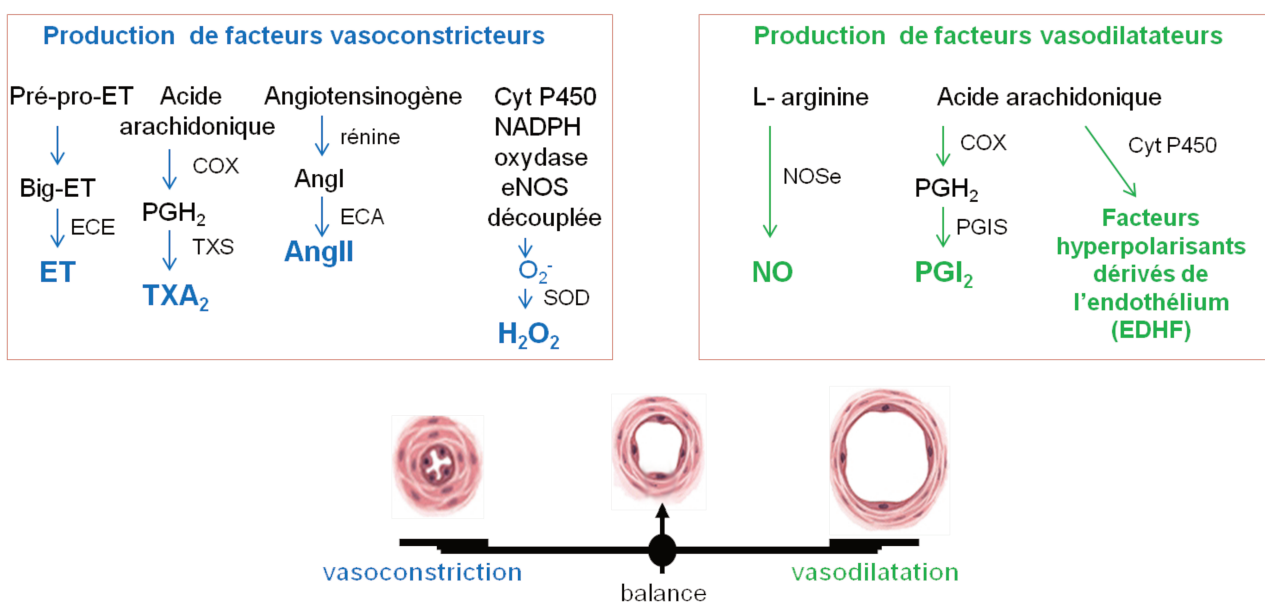
Hémostase vasculaire	Hémodynamique vasculaire
<ul style="list-style-type: none"> <li>échanges sang-tissu (rôles de barrière et de perméabilité)</li> <li>défense contre les pathogènes en produisant des molécules qui modulent la réaction inflammatoire aiguë (IL-1, IL-6, IL-8) et les molécules d'adhésion cellulaire</li> <li>production de facteurs de croissance comme le FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) et CSF (colony stimulating factor)</li> <li>synthèse et sécrétion du facteur de Von Willebrand</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sécrétion des substances vasoactives qui contrôlent le débit sanguin (NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF, ET-1, AngII, TXA<sub>2</sub>, ROS)</li> <li>angiogenèse (formation de néo-vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants) : initiation par prolifération et migration des cellules endothéliales suite à une vasodilatation puis stabilisation du néo-vaisseau par interaction des cellules endothéliales avec des péricytes et les CMVLs</li> </ul>

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

<ul style="list-style-type: none"> <li>• synthèse et sécrétion de molécules inhibant l'agrégation plaquettaire (PGI<sub>2</sub>, NO, thrombomoduline)</li> <li>• synthèse du collagène et des protéoglycans pour assurer le maintien de la membrane basale</li> </ul>	
---	--

**Tableau 2:** Rôles de l'endothélium dans la mécanique artérielle.

Mais le rôle principal de l'endothélium est de réguler les contraintes en réponse à des stimuli chimiques (ACh, substance P, bradykinine, adénosine) ou mécaniques (écoulement du sang) en agissant sur la vasomotricité vasculaire, par la synthèse et la libération de nombreux facteurs vasodilatateurs (NO, PGI<sub>2</sub>, EDFH) ou vasoconstricteurs (ET-1, AngII, TXA<sub>2</sub>, ROS) impliqués dans la modulation du tonus vasculaires des CMVLs sous-jacentes (Figure 11).



**Figure 11:** Production de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs par l'endothélium vasculaire. Les principaux facteurs vasoconstricteurs sont l'endothéline (ET), l'angiotensine II (AngII), les espèces réactives de l'oxygène en particulier les anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Les principaux facteurs vasodilatateurs sont le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF).

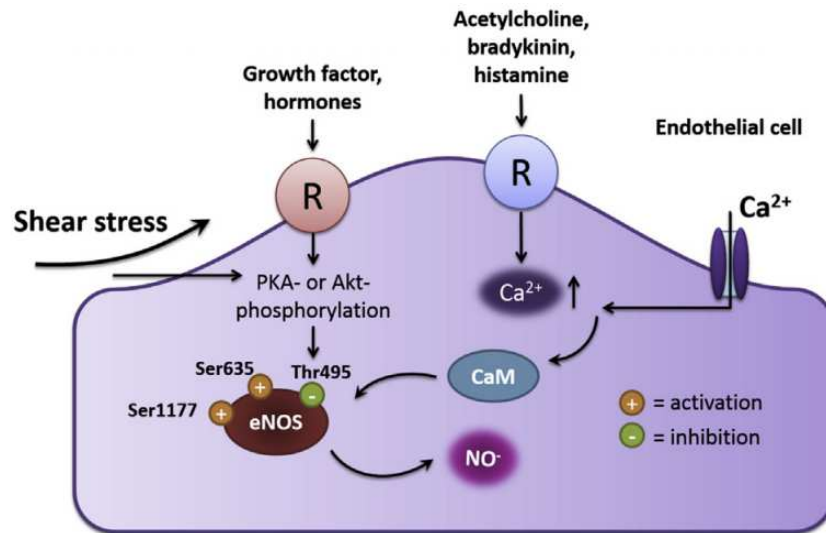
### a) Facteurs vasodilatateurs

#### Le monoxyde d'azote

Le NO est la molécule vasodilatatrice ayant recueilli le plus d'intérêt au cours des dernières années et sans doute la plus importante d'un point de vue physiologique (Ignarro, 1989; Palmer et al., 1987). La

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

biosynthèse du NO et de son co-produit, la L-citrulline, est catalysée par les NO synthases (NOS) à partir de L-arginine (Palmer et al., 1988). Cette réaction nécessite de l'oxygène mais également des cofacteurs comme le NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), le tétrahydrobioptérine (BH4), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et enfin la flavine mononucléotide (FMN) (Zhao et al., 2015). Il existe au moins 3 isoformes de NOS, codées par des gènes distincts (Geller and Billiar, 1998; Moncada et al., 1991). La NOS neuronale (nNOS) se trouve principalement au niveau du système nerveux, la iNOS est l'isoforme inducible rencontrée dans les macrophages, et enfin la NOS endothéliale (eNOS) est retrouvée au niveau des cellules endothéliales vasculaires. Cette eNOS peut être activée par deux voies distinctes: une voie calcium dépendante et une voie indépendante du calcium (Figure 12).



**Figure 12:** Les 2 voies d'activation de la eNOS : dépendante ou indépendante du calcium (Zhao et al., 2015).

- **voie calcium-dépendante**

La liaison de l'acétylcholine à la surface de la cellule endothéliale, au niveau des récepteurs muscariniques de type M2, induit l'augmentation de l'activité de la eNOS via l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induite par la libération d'inositol triphosphate (IP3) couplé à la calmoduline (CaM).

- **voie calcium-indépendante**

Les intégrines (Tzima et al., 2005) ou les récepteurs à activité tyrosine kinase, sensibles aux forces de cisaillement, sont capables, via l'activation de la voie PI3K/Akt d'activer la eNOS par phosphorylation des résidus sérine, en particulier la Ser 1177 chez l'homme (ou Ser 1179 chez le rongeur) (Morello et al., 2009). L'insuline ou le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) sont également capables, en se liant à leurs récepteurs, d'activer cette voie permettant une production de NO.

Une fois synthétisé dans les cellules endothéliales par la eNOS, le NO diffuse, d'une part vers la lumière du vaisseau où il exerce un rôle anti-agrégant et anti-adhérent sur les plaquettes circulantes (Benjamin et al., 1991) et, d'autre part vers les CMVLs adjacentes où il va activer la guanylate cyclase soluble et ainsi augmenter

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

le taux intracellulaire de GMPc ; cette cascade aboutit à une relaxation des CMVLs résultant simultanément d'une baisse de concentration intracellulaire en calcium et d'une désensibilisation de l'appareil contractile de la cellule au calcium (Ignarro, 1989). Le NO est la principale source de vasodilatation dans les artères de conductance (Boo et al., 2002; Celermajer, 1997).

### **La prostacycline**

La prostacycline ou PGI<sub>2</sub>, découverte en 1976 est un dérivé de l'acide arachidonique, formé à partir des phospholipides sous l'action de la phospholipase A2 (Bunting et al., 1976). L'acide arachidonique est un précurseur important dans la synthèse des eicosanoïdes via 2 voies: la voie des COX et la voie de la lipooxygénase. Sous l'action de COX-1 (constitutive) et COX-2 (inductible), l'acide arachidonique est converti en prostaglandine H<sub>2</sub>, elle-même convertie en PGI<sub>2</sub> sous l'action de la prostacycline synthase (PGIS) (Qian et al., 2012). Les forces de cisaillement perçues par la cellule endothéliale induisent la synthèse de PGI<sub>2</sub> soit de façon directe via l'activation des COX, soit de façon indirecte via l'augmentation de la concentration calcique intracytoplasmique (Demirel et al., 1998; Frangos et al., 1985).

La PGI<sub>2</sub> est l'un des prostanoides les plus importants qui régule l'homéostasie vasculaire. Elle permet, tout comme le NO, une vasodilatation et une inhibition de l'agrégation plaquettaire (Moncada et al., 1977; Radomski et al., 1987). L'action vasodilatatrice de la PGI<sub>2</sub> s'opère par une élévation du taux intracellulaire d'AMPC (Flammer and Lüscher, 2010). Mais les effets de la PGI<sub>2</sub> sont intimement liés à ceux du NO. En effet, la PGI<sub>2</sub> facilite la libération endothéliale de NO (Shimokawa et al., 1988) qui, en retour, potentialise l'action des PGI<sub>2</sub> au niveau musculaire par inhibition de la phosphodiesterase, prolongeant ainsi indirectement la demi-vie de l'AMPC (Delpy et al., 1996). Toutefois, la contribution de la PGI<sub>2</sub> à la relaxation endothélium-dépendante est beaucoup moins importante que celle du NO, puisque dans certains territoires vasculaires, son effet ne peut être observé que lorsque les autres voies ont été inhibées (Lüscher et al., 1990). En effet, son action est plus importante dans les territoires vasculaires de petite taille par rapport aux vaisseaux de conductance (Joannides et al., 1995). Enfin, dans les maladies vasculaires, la PGI<sub>2</sub> peut jouer un rôle compensatoire en cas de diminution de la bioactivité de NO (Féléto et al., 2011).

### **L'EDHF**

L'observation d'une hyperpolarisation des CMVLs par l'ACh en présence d'inhibiteurs de NO (L-NAME) et de COX (indométacine) a permis de mettre en évidence de nouveaux facteurs impliqués dans la vasodilatation : les facteurs hyperpolarisant de l'endothélium (EDHF) (Busse et al., 2002). Ces molécules sont capables de produire une hyperpolarisation au niveau de la membrane des CMVLs empêchant ainsi l'entrée du calcium dans la cellule, ce qui a pour conséquence de bloquer la contraction (Sandoo et al., 2010). La nature des EDHF reste controversée mais l'utilisation d'apamine et de charybdotoxine, inhibiteurs spécifiques des canaux SKa et IKa des cellules endothéliales, suggèrent l'implication de ces deux types de canaux dans ce phénomène (Busse et al., 2002).

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

## b) Facteurs vasoconstricteurs

### **L'angiotensine II**

Le système rénine-angiotensine-aldostérone est un système humoral jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie hydrosodée et la régulation de la pression artérielle. La rénine circulante sécrétée par l'appareil juxtaglomulaire rénal convertit l'angiotensinogène, dérivé du foie, en angiotensine I (Danser and Nguyen, 2008). L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) permet la conversion d'AngI en AngII qui exerce ses actions via des récepteurs aux protéines G à 7 domaines transmembranaires dont les récepteurs AT1R et AT2R. La liaison de l'AngII à son récepteur AT1R induit, entre autre, à la contraction, la prolifération et l'hypertrophie des CMVLs, alors que sa fixation au récepteur AT2R pourrait avoir des effets inverses (Nakajima et al., 1995).

### **L'endothéline-1**

L'endothéline est un puissant vasoconstricteur (Hickey et al., 1985), présent sous 3 isoformes de 21 acides aminés chacune : ET-1, ET-2 et ET-3 (Inoue et al., 1989). Dans le système vasculaire, seule l'ET-1 est présente. Cette molécule, produite par l'endothélium, provient du clivage de précurseurs inactifs (les pré-pro-ETs et la Big-ET) par l'enzyme de conversion de l'endothéline (Yanagisawa et al., 1988). La libération de cette molécule est stimulée par des facteurs inflammatoires tels que IL-1, TNF- $\alpha$  et est diminuée par le NO et ou la PGI<sub>2</sub> (Alonso and Radomski, 2003). En se liant à ses récepteurs, ET-A et ET-B au niveau des cellules musculaires lisses, l'ET-1 va induire une vasoconstriction, alors que sa fixation à l'ET-B endothéliale va induire une vasorelaxation (Bacon et al., 1995; Davenport et al., 1995; Tirapelli et al., 2005). L'ET-1 est également capable de provoquer une inflammation. En effet, sa liaison au récepteur ET-A active les macrophages, augmente l'adhérence des neutrophiles sur la paroi vasculaire, augmente les radicaux libres qui entraînent une dysfonction endothéliale. Enfin, l'ET-1 provoque la prolifération des CMVLs en se fixant aux récepteurs ou par activation d'autres facteurs de croissance comme PDGF, ce qui entraîne l'augmentation du ratio média /lumière des vaisseaux (Sandoo et al., 2010).

### **Le thromboxane A<sub>2</sub>**

Le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) est le vasoconstricteur majeur produit par les COXs. En effet, l'endothélium vasculaire permet la synthèse de prostaglandines H<sub>2</sub> à partir de l'acide arachidonique via les COX-1 (Qian et al., 2012). Ces prostaglandines H<sub>2</sub> sont ensuite transformées en TXA<sub>2</sub> par la thromboxane synthase (Qian et al., 2012). Le TXA<sub>2</sub>, par sa fixation sur ses récepteurs (récepteurs TP) qui se trouvent à la fois sur les plaquettes et sur les CMVLs, a des effets pro-agrégants, pro-inflammatoires mais aussi vasoconstricteurs et s'oppose ainsi aux effets de la PGI<sub>2</sub> (Auch-Schwelk et al., 1990). Comme le TXA<sub>2</sub> et la PGI<sub>2</sub> sont, tous les deux, produits par

les COXs, la balance entre ces deux molécules aide au maintien de l'homéostasie du vaisseau (Sandoo et al., 2010).

### **Les espèces réactives de l'oxygène**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comprennent l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $HO^\cdot$ ) et les molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) et l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) (Touyz and Schiffrin, 2004). Dans les vaisseaux, les ROS sont produites par les cellules endothéliales mais aussi par les CMVLs et les fibroblastes. Parmi ces ROS, les anions superoxyde sont des espèces chimiques instables qui possèdent un électron non apparié. Ils sont produits dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique et dans la membrane de plusieurs types cellulaires dont les macrophages et les cellules endothéliales. La production de ROS met en jeu les NADPH oxydases, la xanthine oxydase, la lipoxygénase, le cytochrome P450 ou encore la eNOS découplée (Stroes et al., 1998). En s'associant avec le NO, les  $O_2^-$  permettent la formation de ( $ONOO^-$ ) (Beckman et al., 1990), considérés comme facteurs vasoconstricteurs (Katusic and Vanhoutte, 1989).

Le système permettant de contrebalancer les ROS, protégeant ainsi la cellule du stress oxydatif, est composé de 3 isoformes de la superoxyde dismutase (SOD) : la SOD cytosolique (CuZn-SOD), la SOD mitochondriale (Mn-SOD) et la SOD extracellulaire (EC-SOD). Elles sont responsables de l'élimination de l' $O_2^-$  dans les cellules vasculaires en convertissant l' $O_2^-$  en  $H_2O_2$ . Le  $H_2O_2$  est ensuite converti en  $H_2O$  par la catalase et la glutathion peroxydase (GPX) (Yung et al., 2006). Ainsi, les ROS peuvent moduler directement la réactivité des vaisseaux en intervenant à la fois dans la dilatation et la contraction, dépendant du territoire vasculaire et du type de ROS généré (Touyz and Schiffrin, 2004).

## **2.2.2. Cellules musculaires lisses et réactivité vasculaire**

### **a) Relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire (Figure 13)**

En déterminant le diamètre de la lumière des vaisseaux, la dilatation ou contraction des CMVLs contrôle la pression artérielle et la répartition des débits sanguins. L'état contractile des CMVLs reflète, à chaque instant, l'équilibre entre les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs qui contrôlent le niveau de phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC). La relaxation de la CMVL résulte de la diminution de la concentration et de la sensibilité au  $Ca^{2+}$  intra-cytoplasmique soit par l'expulsion du calcium à l'extérieur de la cellule, soit par son recaptage dans le réticulum endo-sarcoplasmique, soit par l'activation de la phosphatase des MLCP bloquant ainsi l'activation des MLC. Certains médiateurs comme le NO ou la  $PGI_2$  entraînent, par l'action de la guanylate cyclase et de l'adénylate cyclase, l'augmentation de  $GMPc$  et  $d'AMPc$ . Les protéines kinases PKG et PKA sont alors activées et vont être responsables de la phosphorylation du phospholamban. Ce peptide, à l'état non phosphorylé, est un inhibiteur des pompes ATPases- $Ca^{2+}$  dépendantes du réticulum sarcoplasmique (Serca) responsables du recaptage du calcium du cytoplasme vers le réticulum. La levée d'inhibition des

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

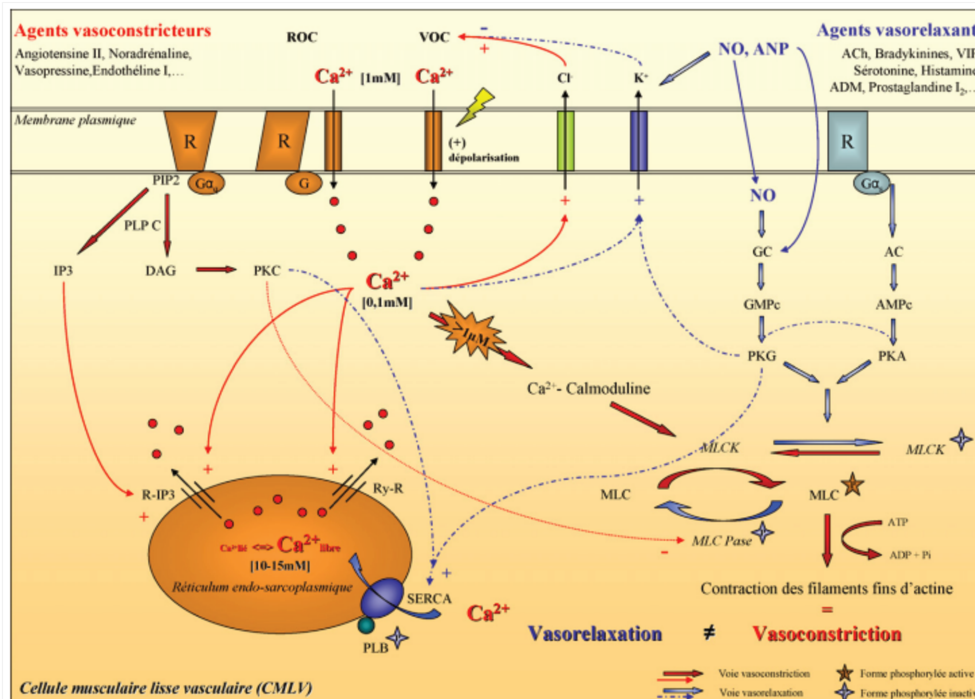
pompes Serca induit alors une relaxation de la CMVL. Par ailleurs, PKG et PKA sont également responsables de la phosphorylation de la Myosin Light Chain Kinase (MLCK), la rendant inactive. Les chaînes légères de myosine ne peuvent ainsi être activées par la MLCK, contribuant ainsi à la relaxation de la CMVL. Enfin, la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  intra-cytoplasmique peut également être due à l'efflux du calcium par stimulation des pompes Serca, de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ou par activation des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants. En effet, après phosphorylation de ces derniers par la PKG ou l'activation directe par le NO, il se produit une hyperpolarisation membranaire qui inhibe l'entrée du calcium via les canaux calciques voltage-dépendants (Collin and Levy, 2008) .

### **b) Contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (Figure 13)**

La vasoconstriction résulte de l'augmentation de la quantité et de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  dans la CMVL. Deux systèmes dépendants et synergiques peuvent être mis en jeu :

- la stimulation des CMVLs par des agonistes vasoconstricteurs tels que l'AngII, l'ET-1, le TXA2 ou encore la vasopressine, la noradrénaline via leurs récepteurs membranaires spécifiques (récepteurs couplés à une protéine G) déclenche une cascade enzymatique mettant en jeu, dans la majorité des cas, la phospholipase C, laquelle hydrolyse le phosphatidylinositol bisphosphate en inositol trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol. L'IP3 libéré va se fixer sur des canaux calciques réticulo-plasmiques assurant leur ouverture et la libération du calcium.
- l'augmentation de calcium intra-cytoplasmique peut être due à une modification du potentiel de membrane. Le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses varie entre  $-45$  et  $-70$  mV et une dépolarisation (rapprochant le potentiel de membrane de 0 mV) induit l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants et l'entrée du calcium extracellulaire dans la CMVL. Ainsi, le calcium intra-cytoplasmique, passant d'une concentration d'environ 0,1 M à l'état basal à une concentration seuil supérieure à 1 M, va se complexer à différentes molécules dont la calmoduline. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ —Calmoduline ainsi formé, active alors la MLCK, responsable de la phosphorylation et ainsi de l'activation MLC. L'activité ATPasique des chaînes légères de myosine permet la contraction des filaments d'actine et ainsi la contraction du muscle lisse vasculaire. Par ailleurs, le diacylglycérol, libéré au cours de cette réaction, active la protéine kinase C, responsable de la phosphorylation de la MLCP devenant ainsi inactive.





**Figure 13:** Mécanismes de la contraction et relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMVL). AC : adénylate cyclase ; ACh : acétylcholine ; ADM : adrénomédulline ; ADP : adénosine diphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ANP : peptide natriurétique atrial ; ATP : adénosine triphosphate ; DAG: diacylglycerol ; Gq : protéine G/sous-unité alpha de type q ; Gs : protéine G/sous-unité alpha de type s ; GC : guanylate cyclase ; GMPc : guanidine monophosphate cyclique ; IP3 : inositol trisphosphate ; MLC : chaîne légère de myosine (Myosine Light Chain) ; MLCK : kinase de la chaîne légère de myosine (Myosine Light Chain Kinase) ; NO : monoxyde d'azote ; Pi: phosphate inorganique ; PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate ; PKA : protéine kinase A ; PKG: protéine kinase G ; PKC : protéine kinase C ; PLB : phospholamban ; R : récepteur couplé à une protéine G ; R-IP3 : récepteur à l'IP3, ROC : canaux récepteur-dépendants (Receptor Operated Channels) ; Ry-R : récepteur à la ryanodine ; SERCA : pompes de recaptage du calcium cytoplasmique (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases) ; VIP : peptide inhibiteur vasoconstriction (Vasoactive Inhibitor Peptide) ; VOC : canaux voltage-dépendants (Voltage Operated Channels) (Collin and Levy, 2008).

### 3. Remodelage vasculaire

Les vaisseaux n'ont pas de structure fixe ; ils peuvent se modifier sous l'influence de stimuli mécaniques, neuronaux ou humoraux, physiologiques ou pathologiques ; ce phénomène est appelé **remodelage**. Le concept de remodelage artériel a été initialement proposé par Baumbach et Heistad en 1989 (Baumbach and Heistad, 1989).

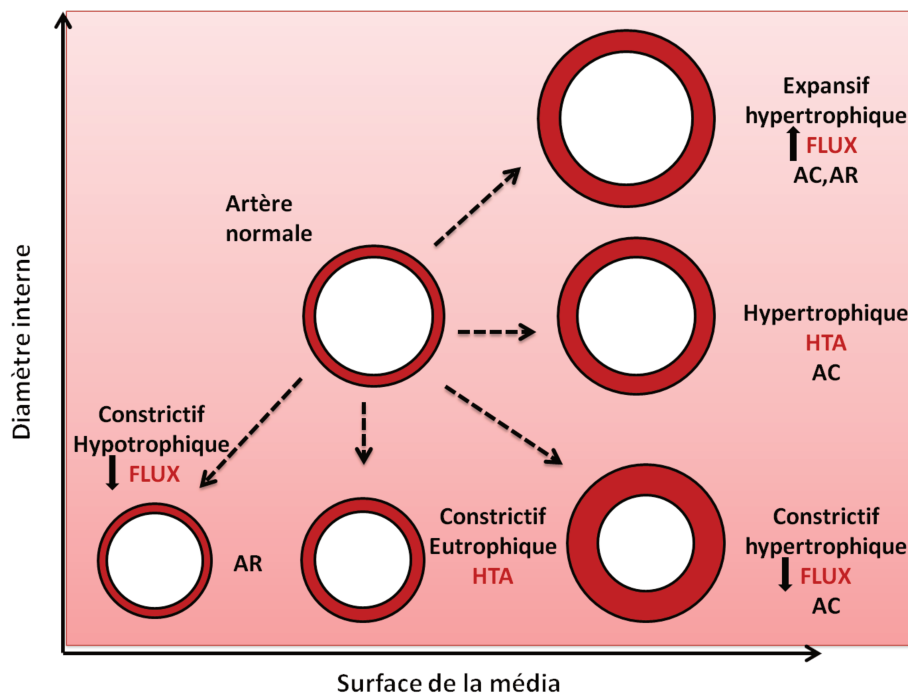
Les artères de conductance et les artères de résistance sont capables de détecter les changements dans l'environnement, d'intégrer les signaux de communication intercellulaire et, grâce à la production locale de

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



médiateurs, d'influer sur leurs structures et leurs fonctions (Renna et al., 2013) par la réorganisation géométrique de la paroi ; ceci aussi bien en réponse à des modifications physiologiques de la circulation sanguine (e.g. l'activité physique qui provoque une augmentation du flux sanguin aboutissant à un accroissement du diamètre vasculaire) qu'à des stimuli pathologiques (e.g. l'HTA ou la diminution du débit sanguin qui conduit à un rétrécissement du diamètre). Ainsi le remodelage désigne la capacité de l'artère à modifier, de façon durable, son calibre (élargissement ou diminution) en faisant intervenir différents processus cellulaires (la croissance, l'apoptose, la migration cellulaire avec production ou dégradation de matrice extracellulaire...). Ce phénomène met en jeu des interactions dynamiques entre les facteurs de croissance générés localement (e.g. VEGF), les substances vasoactives (e.g. AngII ou, ET-1) et les stimuli hémodynamiques (e.g. forces de cisaillements, étirements) (Gibbons and Dzau, 1994).

Une altération chronique du profil hémodynamique entraîne le remodelage de la paroi vasculaire. Suivant les profils hémodynamiques, différents types de remodelage vasculaire peuvent se développer. Les mécanismes qui déterminent ces différentes formes de remodelage sont complexes, mais semblent être initiés par des variations de pression, de débit, ou de l'environnement hormonal perçu par le vaisseau.



**Figure 14:** Les différents types de remodelage existants en fonction des modifications de surface de la média et de diamètre interne dans les artères de conductance (AC) et de résistance (AR), adapté de Mulvany et coll (Mulvany et al., 1996).

En réponse à différents stimuli, le vaisseau est capable de s'adapter en faisant varier sa masse pariétale (surface de la media) ou son diamètre, ou les 2. Les variations de masse pariétale peuvent être soit de type **hypertrophique** (augmentation de la quantité de matériau avec augmentation de la surface sectionnelle), soit

de type **hypotrophique** (diminution de la quantité de matériau). Quant aux variations du diamètre, il est possible d'observer soit une diminution du diamètre interne signe d'un remodelage **constrictif** (généralement néfaste) (Castorena-Gonzalez et al., 2014; Chantler and Frisbee, 2015), soit à une augmentation de ce diamètre signe d'un remodelage **expansif** (bénéfique) (Osol and Mandala, 2009; Whyte and Laughlin, 2010). Les vaisseaux qui ne présentent que des modifications de diamètre sans évolution de leur masse pariétale font un remodelage dit **eutrophique** (Figure 14).

L'augmentation chronique de pression provoquée par l'hypertension va induire un remodelage hypertrophique des artères de conductance (Flamant et al., 2007) et un remodelage eutrophique constrictif au niveau des artères de résistance (Prewitt et al., 2002). L'augmentation chronique de flux va induire un remodelage expansif hypertrophique dans les artères de conductance (Tronc et al., 1996) et de résistance (Vessières et al., 2012). Au contraire, une baisse de débit chronique provoque un remodelage constrictif hypertrophique des artères de plus gros calibre (Langille and O'Donnell, 1986; Tang et al., 2008) et un remodelage constrictif hypotrophique des artères musculaires (Baron-Menguy et al., 2010). Ces différents types de remodelage sont approfondis dans le chapitre 5 ci-dessous.

### 3.1. Remodelage artériel et hypertension

#### 3.1.1. Artères de conductance et remodelage dû à l'hypertension artérielle

La capacité des gros vaisseaux à faire varier activement leur diamètre par une contraction de leurs CMVLs est très limitée. Aussi, dans ces vaisseaux, une augmentation graduelle de la pression luminale est accompagnée d'une augmentation durable du stress pariétal, stimulant de ce fait une **réponse hypertrophique**. Ceci aboutit à un épaississement de la média, associé à une augmentation du nombre et/ou de la taille des CMVLs et de la quantité de matrice extracellulaire (MEC). Cette réponse hypertrophique permet ainsi de normaliser la tension pariétale. Au cours de l'hypertension artérielle, le remodelage hypertrophique d'artères a deux conséquences fonctionnelles :

- à court et à moyen termes, il préserve les propriétés élastiques de la paroi artérielle
- à long terme il potentialise le développement de l'athérosclérose en effet, alors que son but initial est de maintenir une perfusion tissulaire efficace malgré les agressions subies par la paroi artérielle, ce remodelage peut, à terme, avoir des conséquences néfastes, notamment sur la rigidité artérielle ou la constitution de la plaque d'athérome.

#### Mécanismes

Les intégrines joueraient un rôle important dans le remodelage hypertrophique en transmettant le stimulus mécanique vers l'intérieur de la cellule. Une fois stimulées, les intégrines activent les MAP kinases provoquant l'augmentation de facteurs de transcription (c-fos) et l'expression de plusieurs protéines comme les métalloprotéases (MMPS), ICAM-1 ou IGF-1. D'autres parts, le NO joue un rôle majeur dans l'état de quiescence des CMLVs alors que l'ET-1 et l'AngII, toutes deux augmentées en cas d'HTA, agissent comme des

promoteurs de la croissance cellulaire. Ceci contribuerait donc au remodelage hypertrophique (Flamant et al., 2007).

D'autres facteurs de croissance, comme le PDGF (platelet-derived growth factor ou facteur de croissance dérivé des plaquettes), peuvent également être impliqués dans la réponse hypertrophique en réponse à l'augmentation de pression (Mulvany et al., 1996). En effet, en cas d'hypertrophie, l'expression de l'isoforme PDGF-A est accrue au niveau de l'aorte des rats spontanément hypertendue et dans les artères de rats soumis à une hypertension d'origine rénale (modèle 1 rein-1 clip) (Boumaza et al., 2001).

Enfin, bien que le contenu en élastine de la paroi vasculaire, en présence de remodelage hypertrophique associé à l'hypertension artérielle (Hadjiisky et al., 1987) ne soit pas modifié, la structure de l'élastine semble être modifiée avec une diminution de la taille de ses fenestrations (Boumaza et al., 2001).

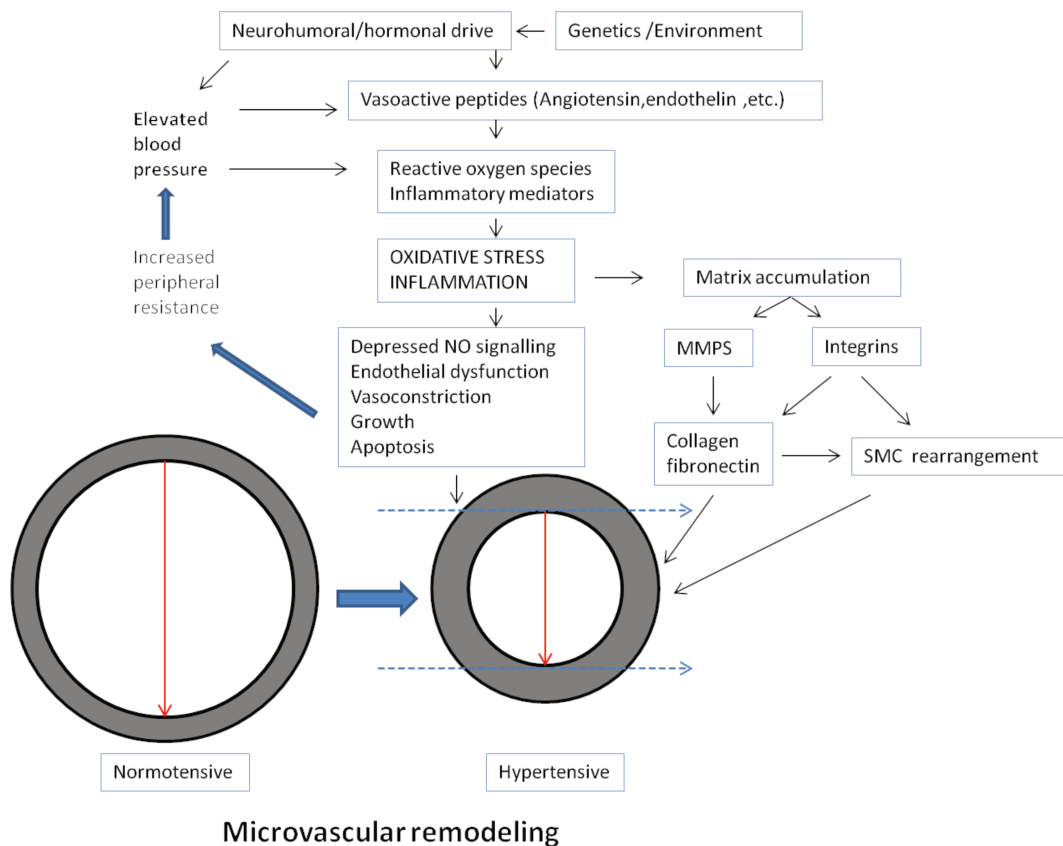
### 3.1.2. Artères de résistance et remodelage dû à l'hypertension artérielle

Au niveau des artères de résistance, la vasoconstriction chronique et l'hypertension sont toutes associées au rétrécissement de la lumière et par la suite au **remodelage constrictif** (Huelsz-Prince et al., 2013). L'activation des mécanismes de développement d'une HTA (cause génétique et/ou environnementale, systèmes neuro/hormonaux) aboutit à l'augmentation du stress oxydant et de l'inflammation (Intengan and Schiffrin, 2001) ; ce qui va induire une dysfonction endothéliale due à la réduction de la biodisponibilité du NO d'une part, et une vasoconstriction avec la croissance et l'apoptose des CMVLs accompagnée par des modifications de la MEC d'autre part (Touyz, 2005). Ainsi, en cas d'augmentation de pression artérielle, l'accroissement du tonus myogénique va céder progressivement la place à un réarrangement du matériel pariétal autour d'une lumière plus petite, ce processus étant appelé **remodelage eutrophique**. Le remodelage constrictif eutrophique entraîne alors une réduction durable du calibre des vaisseaux de résistance, et constitue la base structurale de l'accroissement des résistances vasculaires dans l'HTA. L'augmentation de la masse pariétale (**hypertrophie**), quant à elle, ne serait qu'un mécanisme compensatoire du remodelage eutrophique devenant insuffisant, à lui seul, pour normaliser le stress pariétal (Pries et al., 2005). Ce remodelage hypertrophique, bien que généralement observé dans les artères de conductance, peut se retrouver dans les artères de résistance chez des patients présentant une hypertension réno-vasculaire (Rizzoni et al., 1996). L'épaississement de la média est alors associée à la prolifération et l'hypertrophie des CMVLs et à une synthèse accrue de la MEC (collagène, fibronectine et glycosaminoglycanes) (Touyz et al. 2001). Au cours de l'HTA, le remodelage hypertrophique peut également être associé à l'activation du système de l'ET-1 (Schiffrin 2000). Ce type de remodelage, initialement adaptatif, devient finalement délétère en ayant des conséquences dramatiques sur la pression de perfusion locale et l'apport sanguin des organes cibles compromettant leur fonction, et contribuant ainsi aux complications cardiovasculaires de l'HTA.

## Mécanismes

Ce processus nécessite la transmission de l'information des CMVLs activées à la MEC via les intégrines pour aboutir au réarrangement de la fibronectine, des fibres de collagène et de la matrice extracellulaire (Bakker et al., 2004). Ce réarrangement matriciel nécessite les MMPs et correspondrait à une autorégulation des CMVLs permettant de diminuer le diamètre interne sans dépense énergétiques (Martinez-Lemus et al., 2004) (Figure 15).

De nombreux processus cellulaires peuvent être impliqués dans le remodelage. Des études cliniques et expérimentales ont montré que l'augmentation de la production de ROS, par un accroissement de l'activité de la NADPH oxydase et des réactions inflammatoires (attachement et migration des leucocytes), était au centre de nombreuses perturbations dont des modifications de la matrice extracellulaire, aboutissant ainsi à l'augmentation du ratio paroi/lumière (Savoia and Schiffrin, 2007). La stimulation de l'activité NADPH oxydase serait due à des niveaux élevés d'AngII circulante (Touyz, 2005), augmentant ainsi l'expression de médiateurs de l'inflammation, de molécules d'adhésion et ainsi des MMPs, notamment MMP-2 et MMP-9 qui jouent un rôle central dans la migration des CMVLs et leur réorganisation.

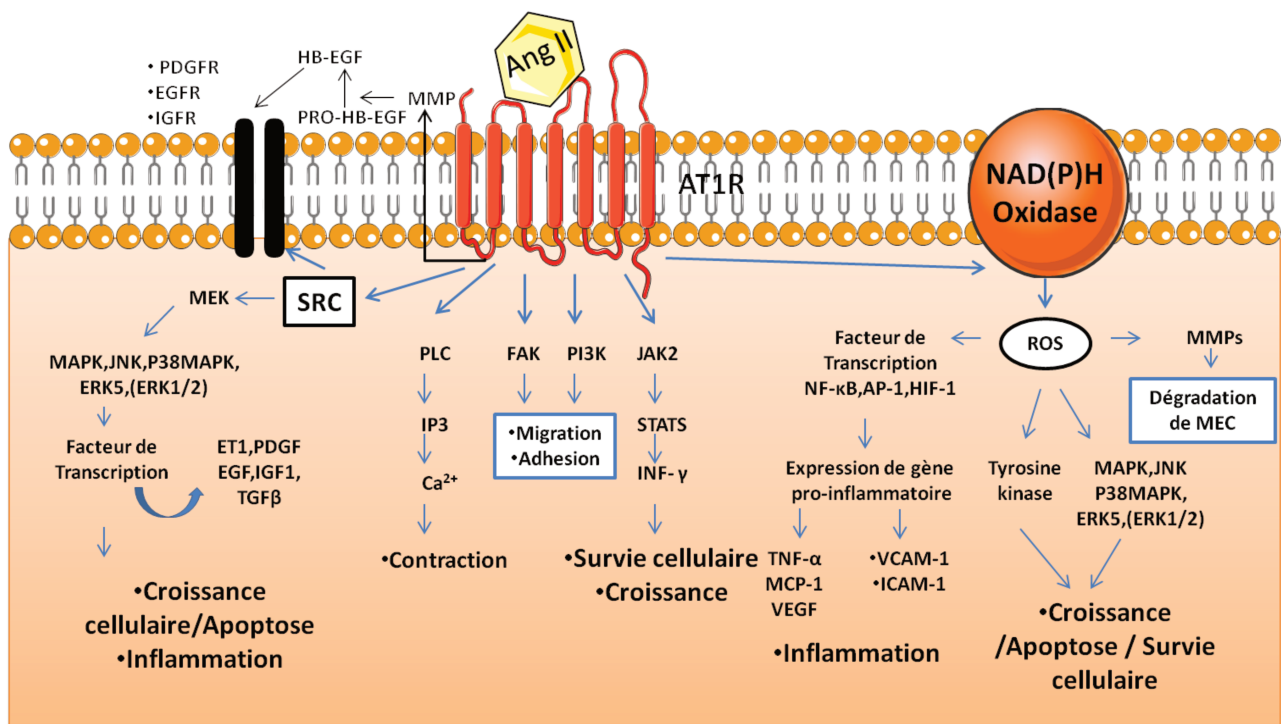


**Figure 15:** Mécanismes physiopathologiques conduisant au remodelage des artères de résistance en cas d'hypertension artérielle (Intengan and Schiffrin, 2001).

## L'angiotensine II (Figure 16)

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

La liaison de l'AngII (fortement exprimée dans la plupart des cas d'hypertension) à son récepteur AT1R induit l'activation de kinases telles que c-Src, FAK, PI3K et JAK2 qui, à leurs tours, activent des molécules de signalisation telles que MEK/MAPK agissant sur l'inflammation, la croissance, l'apoptose, la migration et la survie cellulaire. D'autre part, le couple AngII/AT1R stimule la voie PLC-IP3 induisant la libération de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire nécessaire à la contraction des CMVLs mais également les MMPs capables de libérer la liaison héparine de l'EGF (epidermal growth factor) (Saito and Berk, 2001). De plus, l'AngII active des récepteurs à activité tyrosine kinase, même si elle ne peut pas se lier directement dessus; ce processus de transactivation a été démontré pour les récepteurs de l'EGF, du PDGF et de l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1 ou facteur de croissance ressemblant à l'insuline ou somatomédine C) (Saito and Berk, 2001). En cas d'hypertension, l'AngII augmente la production d'hormones vasoactives telles que l'ET-1, mais aussi des facteurs de transcription comme le TGFβ (transforming growth factor), le bFGF (basic fibroblast growth factor, le facteur de croissance basique des fibroblastes) et l'IGF-1. Enfin, l'AngII relaye plusieurs actions cellulaires en stimulant la formation de ROS (Shi et al., 1999) ; en effet, l'AngII est un puissant stimulateur vasculaire de la NADPH oxydase (Griendling et al., 1994).



**Figure 16:** Voies de signalisation induites par l'angiotensine II (AngII) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules musculaires lisses vasculaires adapté de touyz (Touyz, 2005).

### Le stress oxydant (Figure 16)

L'élévation de la pression artérielle provoque un stress oxydant (Barton et al., 2001; Griendling et al., 2000). Ainsi l'activation de la NADPH oxydase par l'AngII induit une production accrue d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aboutissant à une augmentation de la quantité de ROS dans le vaisseau. Cette augmentation va alors stimuler l'activation de facteurs de transcription tels que NF-kB, AP-1 et HIF-1 qui à leurs tours vont activer les gènes pro-inflammatoires pour produire des cytokines et des chimiokines et induire l'expression de molécules d'adhésion cellulaire. Les ROS sont donc impliqués dans presque tous les stades de la réponse inflammatoire, y compris la perméabilité vasculaire, l'adhésion des leucocytes et leur transmigration, la chimiotaxie, la croissance cellulaire et la fibrose (Harrison et al., 2003). L'équipe de Martinez-Lemus en 2011 a pu montrer que la stimulation prolongée d'artères de résistance avec de la noradrénaline associée à l'AngII induisait une activation des MMPs dépendante de l'activation des ROS (Martinez-Lemus et al., 2011). Ainsi, en plus de sa capacité à activer les voies des MAP kinases (p38, JNK et ERK5) et des canaux ioniques tout en réprimant la voie des tyrosines kinases, les ROS sont capables d'activer la voie des MMPs permettant ainsi la réorganisation de la paroi (Touyz, 2005)

### **L'inflammation**

Dans l'hypertension artérielle, une relation étroite entre remodelage constrictif des artères de résistance et inflammation, liée à l'action de l'AngII, de l'ET-1, et à la production de ROS a été montré (Savoia and Schiffrin, 2006). Mais, les cytokines pro-inflammatoires sont également capables d'activer directement la NADPH oxydase responsable du remodelage (Chabrashvili et al., 2002; Chandramohan et al., 2008)

D'une part, l'angiotensine II, via le stress oxydant, favorise l'inflammation en activant NF-kB (facteur nucléaire-kappa beta), qui à son tour va déclencher la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Vaziri, 2008) notamment VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1 ou protéine d'adhésion de cellule vasculaire) et la E-sélectine (Pueyo et al., 2000). L'AngII module également la production de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1 ou protéine chimiotactique des monocytes) et de l'interleukine 6 (IL-6), stimulant ainsi le recrutement des leucocytes mononucléaires au niveau de la media. Ces facteurs sont augmentés dans le plasma de patients hypertensifs et reflètent l'état d'inflammation vasculaire (Hlubocká et al., 2002).

Ainsi, le stress oxydant et l'inflammation sont impliqués dans un cercle vicieux dans lequel l'activation de l'un entraîne la stimulation de l'autre, avec deux éléments intermédiaires majeurs: les ROS et NF-kB (Figure 12).

Enfin le système immunitaire semble jouer un rôle direct dans le remodelage constrictif associé à l'hypertension (Ko et al., 2007). Au cours de l'inflammation, l'activation des macrophages entraîne la sécrétion de diverses cytokines notamment TNF $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale alpha) qui stimule le processus inflammatoire vasculaire impliqué dans l'HTA (Warren and Ralph, 1986). L'infiltration des cellules immunitaires entraîne la production excessive d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et l'expression d'AngII, ces derniers contribuant au stress oxydant et au remodelage (Nava et al., 2003; Rodriguez-Iturbe et al., 2003) .

### **La transglutaminase tissulaire**

Les premières études sur artères mésentériques isolées ont montré qu'en présence de sérum de veau fœtal, les vaisseaux développaient une vasoconstriction progressive suivie d'un remodelage constrictif sans

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



modification de la surface de la média (Bakker, et al. 2000). Des études plus poussées ont permis de démontrer que le processus de remodelage constrictif eutrophique nécessitait la transmission de l'information des CMLVs activées à la MEC, via les intégrines  $\beta_3$ , et aboutissait au réarrangement des fibres de collagène et de la MEC (Bakker et al., 2004). Ce réarrangement matriciel correspond à une autorégulation de la taille des CMLVs permettant de diminuer le diamètre interne sans dépense énergétique (Martinez-Lemus et al., 2004). Malgré tout, pour permettre cette réorganisation, les liaisons covalentes entre cellules doivent être modifiées. Malgré les études indiquant que les intégrines sont impliquées dans ce processus, en particulier les  $\alpha_v\beta_3$  intégrines (Bakker et al., 2004; Heerkens et al., 2006), un autre candidat semble impliqué dans le processus de réorganisation de la matrice et donc dans le remodelage : la transglutaminase tissulaire ou transglutaminase 2 (tTG), enzyme de liaison des protéines, médiateur de l'interactions entre les intégrines et la MEC (Griffin et al., 2002).

Plusieurs études ont montré que la tTG joue un rôle important dans le remodelage vasculaire constrictif. En effet, le remodelage constrictif induit par l'ET-1 ou la phényléphrine au niveau des artères mésentériques est bloqué par des inhibiteurs de la tTG (cystamine) (Bakker et al., 2005; Eftekhari et al., 2007). L'utilisation de L-NAME (L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester, inhibiteur de NO synthase) chez des souris tTG<sup>+/+</sup> provoque une augmentation de la pression artérielle associée à un remodelage constrictif des petites artères, absent chez les souris tTG<sup>-/-</sup> déficientes en tTG malgré l'augmentation de pression artérielle (Pistea et al., 2008). Pourtant, des études contradictoires utilisant les inhibiteurs de la tTG mettent cette enzyme hors de cause en cas de remodelage constrictif dû à l'augmentation de pression. En effet, un traitement à la cystamine chez des rats hypertendus ne modifie pas les propriétés vasculaires malgré la réduction de pression artérielle (Engholm et al., 2011).

## 3.2. Remodelage artériel et variations de flux sanguin

### 3.2.1. Artères de conductance et remodelage en réponse à des variations de flux

Des changements du flux sanguin conduisent à une réponse compensatrice de la paroi vasculaire afin de normaliser les contraintes de cisaillement perçues par les cellules endothéliales. La réorganisation structurale de la paroi artérielle après des changements chroniques de flux sanguin a été étudiée principalement dans les grosses artères permettant une meilleure compréhension des maladies telles que l'athérosclérose et les anévrismes.

Dans le cas d'une **augmentation persistante du flux sanguin**, le remodelage adaptatif du vaisseau implique la réorganisation des composants cellulaires et extracellulaires autour d'un diamètre artériel plus grand, associé à son épaissement. Ce processus a été décrit pour la première fois dans les modèles cliniques de fistules artério-veineuse (FAV) ; les fortes augmentations de flux induites par la liaison entre l'artère et la veine (Shumacker, 1970), aboutissent à un ajustement du diamètre de l'artère correspondante suite à la restructuration de la matrice extracellulaire et à la modulation de la capacité de synthèse des CMVLs (Lehoux et al., 2002). Au niveau expérimental, des études ont également montré que le flux sanguin en aigu (Pohl et al.,

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

1986) et en chronique régulaient le diamètre des artères en association avec la réorganisation des composants cellulaires et extracellulaires de la paroi vasculaire (Langille et al., 1989). Cette réponse était liée à une réaction des cellules endothéliales (Hull et al., 1986).

De nouveaux modèles de ligature ont ensuite été mis au point afin d'étudier le remodelage en réponse à une augmentation et à une baisse de flux comme les modèles de ligature des carotides. Des études expérimentales de ligature carotidienne chez le rat ont montré que la structure des vaisseaux était modifiée après 4 semaines de ligature de la carotide gauche (Miyashiro et al., 1997). En effet, la carotide ligaturée avait un diamètre externe considérablement diminué (associé à une baisse de flux de 93%) alors que la carotide contro-latérale voyait son diamètre augmenté (en association avec une augmentation de flux de 46%). Ainsi, suite à une **diminution chronique du flux**, les artères de conductance seraient plutôt soumises à une diminution de leur diamètre.

## Mécanismes

### **Le monoxyde d'azote**

Le NO joue un rôle majeur dans le remodelage au flux. En effet, dans les artères exposées à des augmentations chroniques de flux (ligature carotidienne), la production de NO est augmentée (Miller and Burnett, 1992) en relation avec l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) (augmentation de l'expression dans la carotide ayant son débit augmenté et diminution d'expression dans la carotide ligaturée) (Miyashiro et al., 1997), des forces de cisaillement et de l'augmentation de diamètre artériel (Tuttle et al., 2001). Dans un modèle expérimental de FAV entre l'artère carotide commune gauche et la veine jugulaire externe, Tronc et son équipe ont montré que l'augmentation de diamètre de l'artère en réponse à l'augmentation de débit, était contre-balancé par un traitement de 4 semaines au L-NAME. Ainsi, l'utilisation de ces modèles a permis de prouver que le remodelage vasculaire induit par des modifications du flux sanguin était en lien avec les contraintes de cisaillement perçues par l'endothélium et sa réponse NO-dépendante (Miyashiro et al., 1997; Tronc et al., 1996).

### **Le stress oxydant**

Plusieurs autres études ont montré que les ROS étaient également impliquées dans l'activation des MMPs (Grote et al., 2003; Rajagopalan et al., 1996). Ainsi, il est probable que le peroxy-nitrique ( $\text{ONOO}^-$ ), formé à partir de NO et d' $\text{O}_2^-$ , active les MMPs. En effet, l'utilisation du modèle de ligature carotidienne chez le lapin a permis de mettre en évidence la présence d' $\text{ONOO}^-$  dans la paroi artérielle de la carotide non ligaturée (ayant un flux augmenté) comparée à des vaisseaux traités au L-NAME (Tronc et al., 1996). Pour évaluer le rôle de la NADPH oxydase dans ce processus, l'équipe de Castier et coll a développé un nouveau modèle de FAV reliant l'artère carotide droite commune avec la veine jugulaire adjacente chez des souris déficientes en p47phox ou en gp91phox, deux sous-unités de la NADPH oxydase. Ils ont pu démontrer que la contrainte de cisaillement engendrée par l'augmentation de flux activait uniquement la sous-unité p47phox de la NADPH oxydase générant ainsi du  $\text{ONOO}^-$  qui active les MMPs et facilite le remodelage artériel (Castier et al., 2005).

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



### **Les métalloprotéinases matricielles**

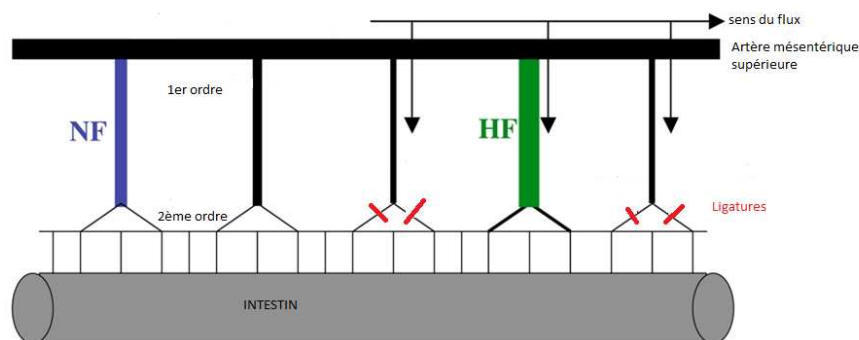
Dans le modèle de FAV, une des caractéristiques marquantes de la paroi artérielle, après augmentation du débit, est la fragmentation des lames élastiques internes par l'intervention des MMPs (Greenhill and Stehbens, 1987; Tronc et al., 1996) dont MMP-2 et MMP-9, hyper-activées peu de temps après la création de la fistule. Cette sur-activité persiste jusqu'à l'augmentation du diamètre du vaisseau et à la normalisation de la contrainte de cisaillement (Karwowski et al., 1999; Tronc et al., 2000)

. D'autre part, plusieurs études ont rapporté que l'inhibition des MMPs empêchait la dégradation de l'élastine (Tronc et al., 2000), diminuant ainsi l'augmentation de diamètre engendré par l'augmentation de flux, dans les modèles de FAV chez le rat (Karwowski et al., 1999) et le lapin (Tronc et al., 2000). Par la suite, des études expérimentales ont mis en évidence un rôle du NO comme important régulateur des MMPs. En effet, dans les modèles de FAV, l'inhibition de la eNOS par le L-NAME réduit l'activation des MMPs (Tronc et al., 2000) et limite l'augmentation de diamètre de l'artère (Guzman et al., 1997; Tronc et al., 1996).

#### **3.2.2. Artères de résistance et remodelage en réponse à des variations de flux**

Les artères de résistance sont elles aussi capables de modifier leur structure suite à différents stimuli, le type de réponse étant dirigé par le tonus vasculaire (Bakker et al., 2008a). Ainsi, un remodelage **expansif hypertrophique** (augmentation du diamètre et de la masse pariétale) se produit dans des conditions physiologiques (augmentation de flux) telles que l'exercice physique, la grossesse, le développement fœtal, mais également dans la croissance tumorale et joue un rôle clé dans l'angiogenèse et l'artériogenèse (Cousin et al., 2010; De Mey et al., 2005). Le **remodelage restrictif** se produit plutôt dans des conditions pathologiques (diminution de flux) comme les maladies ischémiques, le diabète et l'hypertension (Mulvany, 2002).

Le modèle le plus utilisé pour étudier le remodelage des artères de résistance en réponse au flux est le modèle de ligature des artères mésentériques. En effet, l'architecture de la circulation mésentérique est constituée d'un réseau en arcade, ce qui permet la modification chirurgicale du flux sanguin sans ischémie tissulaire. Des artères de 2<sup>nd</sup> ordre sont ligaturées afin d'en diminuer le flux (bas flux, BF) ; l'artère située entre les 2 vaisseaux ligaturés voit son flux augmenter (haut flux, HF) ; les vaisseaux situés à distance des ligatures gardent un flux normal (NF). Ces modifications se font sans modification de la pression artérielle ou de l'environnement hormonal (Figure 17).



**Figure 17:** Représentation du système de ligatures ; les ligatures des artères de 2<sup>nd</sup> ordre entraînent une baisse de flux dans l'artère de 1<sup>er</sup> ordre correspondante. L'artère située entre les deux vaisseaux ligaturés est désignée comme artère haut-flux (HF). Les artères situées à distance des ligatures ont un débit normal (NF) (Loufrani and Henrion, 2008).

## Mécanismes (Figure 18)

### L'inflammation

En réponse à des variations de flux, les cellules inflammatoires jouent un rôle crucial dans le remodelage des artères de résistance. En effet, il a été démontré que l'augmentation des forces de cisaillement en réponse à une augmentation de flux attirait les monocytes (Heil and Schaper, 2004). Ces cellules inflammatoires peuvent ainsi contribuer directement au remodelage, par la libération d'enzymes de dégradation de la matrice telles que les MMP-9 dont une augmentation d'expression est observée (Bakker et al., 2008a; Castier et al., 2005; Retailleau et al., 2010). Bien que les leucocytes peuvent faciliter le remodelage expansif, ils peuvent également contribuer à un remodelage constrictif grâce aux macrophages (Bakker et al., 2006). En 2008, Bakker et ses collègues ont montré que les artères de résistance exposées à une diminution ou à une augmentation de flux sanguin avaient une proportion de macrophages dans l'adventice plus importante. D'autre part, les remodelages constrictif et expansif de ces artères étaient inhibés par l'élimination des monocytes et des macrophages suite à une perfusion de clodronate encapsulé dans des liposomes ; ce qui indique que l'altération du flux sanguin déclenche une réponse inflammatoire (Bakker et al., 2008a). En effet, l'expression des marqueurs CD68 (marqueur de macrophages), CD11b (marqueur de leucocytes activés), TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (cytokines associées à la réponse inflammatoire T-helper 1, Th1) sont augmentés de façon similaire dans les vaisseaux à haut et bas flux (Bakker et al., 2008a). Par contre, l'expression d'IL-4 (cytokine associée à des lymphocytes T auxiliaires 2, Th2) est significativement augmentée dans les vaisseaux à faible débit, contrairement aux vaisseaux à haut débit (Bakker et al., 2008a). Enfin, la réaction inflammatoire n'est pas seulement caractérisée par une régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires, mais elle est également accompagnée par l'augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires (TGF $\beta$ , IL-10) (Bakker et al., 2008a).

### L'angiotensine II

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

L'hypertrophie de la paroi artérielle, associée à l'augmentation du diamètre dans les artères à haut flux, implique la production locale d'AngII (Su et al., 1998). L'inhibition de la conversion de l'angiotensine I en AngII par le perindopril, ou le blocage du récepteur AT1R par le candesartan, empêchent cette hypertrophie sans affecter l'augmentation de diamètre (Cousin et al., 2010). Ceci est en accord avec d'autres travaux antérieurs montrant l'implication du système rénine-angiotensine local dans la réponse vasculaire aux forces de cisaillement (Matrougui et al., 2000). Il a également été montré que l'action hypertrophique de l'AngII passait par l'activation d'ERK1/2.

D'autre part, l'AngII, via l'activation d'ERK1/2, joue un rôle majeur dans le remodelage constrictif. En effet, des études *in vitro* ont montré que le périndopril, le candésartan mais aussi le PD98059 (bloqueur d'ERK1/2) réduisent la contractilité à l'AngII des vaisseaux (Baron-Menguy et al., 2010). *In vivo*, ces mêmes inhibiteurs empêchent la réduction de diamètre dans les artères à bas flux (Baron-Menguy et al., 2010)

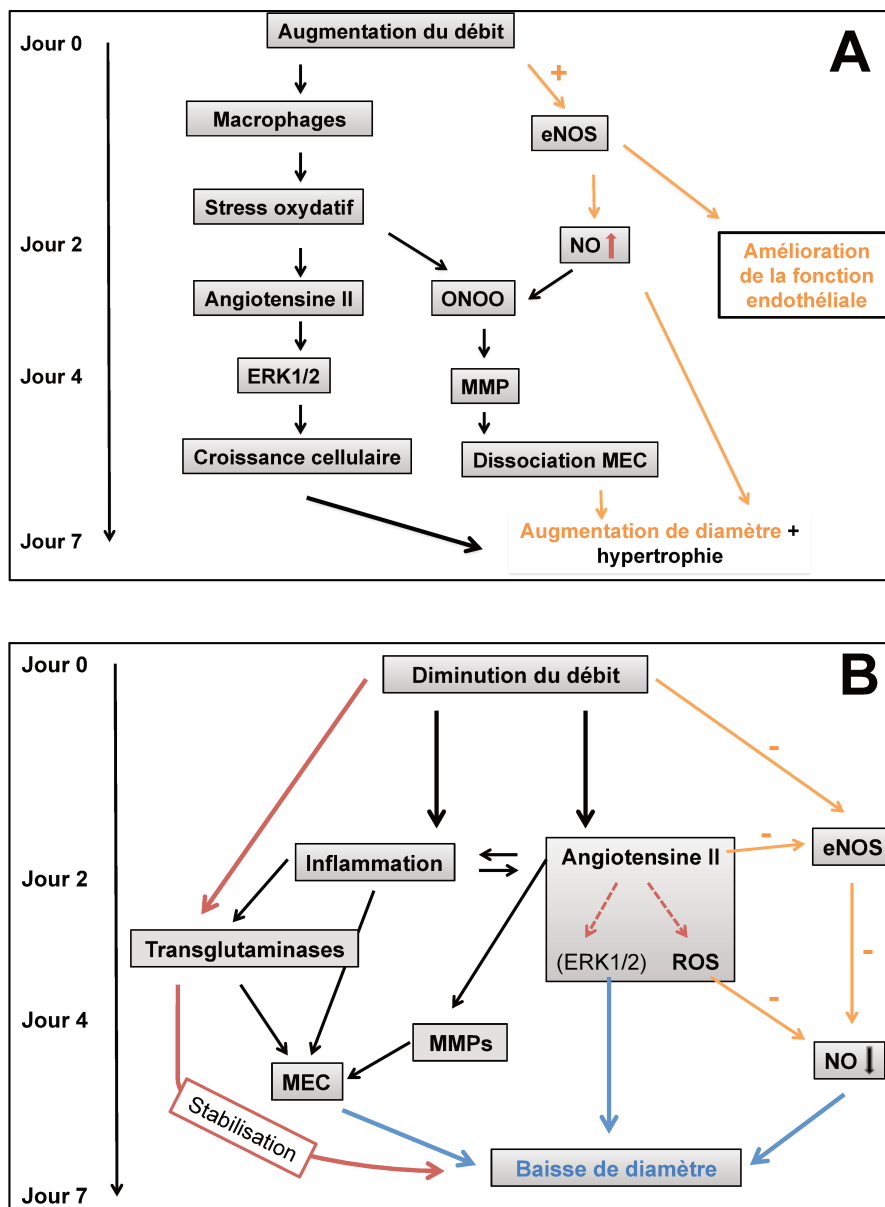
### **Le monoxyde d'azote et le stress oxydant**

L'équipe de Baron-Menguy a pu montrer que la réduction de diamètre des artères à bas flux était associée à une réduction de la relaxation dépendante de l'endothélium et à la sous-expression de la eNOS (Baron-Menguy et al., 2010). Ainsi, une réduction de flux diminue la stimulation des cellules endothéliales qui produisent alors moins de NO, ne permettant plus de contre-balancer les effets vasoconstricteurs de l'AngII et la surproduction d'ions  $O_2^-$ . Néanmoins, la réduction du niveau d'ions  $O_2^-$  (tempol ou apocynine) n'a pas empêché remodelage constrictif. A l'inverse, les cellules endothéliales des artères à haut flux expriment une plus grande quantité de eNOS par rapport à des artères contrôles (Bouvet et al., 2007; Dumont et al., 2007) ce qui aboutit à une augmentation de production du NO, indispensable à l'augmentation de diamètre du vaisseau (Dumont et al., 2007). Dans ces mêmes artères, il a été montré une hausse du niveau des ROS (Bouvet et al., 2007; Dumont et al., 2008). Ces ROS proviendraient non seulement des macrophages (Forman and Torres, 2001) mais également du NO, source principale d'ions  $ONOO^-$ , qui à son tour activerait les MMPs (Retailleau et al., 2010).

### **La transglutaminase tissulaire**

Le remodelage constrictif des artères mésentériques de rat induit par une diminution du flux sanguin fait également intervenir les tTG. Il a été montré que l'inhibition de la tTG atténuait le remodelage constrictif dû à une baisse de flux (Bakker et al., 2005). En effet, chez des souris déficientes en transglutaminase tissulaire (souris  $tTG^{-/-}$ ), il a été observé que bien que le remodelage constrictif dû à une baisse de flux ne soit pas inhibé, son apparition était retardée. mettant en avant l'implication du facteur XIII (transglutaminase circulante) libéré par les macrophages présents dans l'adventice (Bakker et al., 2006). Dans ce modèle, il a également été montré que le remodelage était inhibé par l'élimination des monocytes et des macrophages grâce à une perfusion de clodronate encapsulé dans des liposomes, suggérant également un rôle de l'inflammation (Bakker et al., 2008a, 2008b; Matlung et al., 2009).

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



**Figure 18:** Mécanismes de remodelage en réponse à des variations de débit : l'augmentation (A) ou la diminution (B) du flux induisent une réponse inflammatoire responsable d'un stress oxydatif et de synthèse d'angiotensine II. Il en résulte une activation des métalloprotéinases (MMP) qui provoquent une dissociation partielle de la matrice extracellulaire (MEC) avec une activation de la transglutaminase (qui stabilise la paroi vasculaire) dans l'artère à bas flux. La suite dépend alors du stimulus de base. Dans les artères soumises à une augmentation de débit, l'endothélium est sur-stimulé et produit plus de NO. Ce dernier agit sur la paroi dissociée par les MMPs et augmente le diamètre artériel. Dans les artères soumises à une baisse de débit, l'endothélium est sous-stimulé et produit moins de NO. Ce dernier ne contrebalance plus l'angiotensine II qui peut alors contracter l'artère. Dans tous les cas, le remodelage sera stabilisé lorsque le diamètre aura atteint un niveau permettant de normaliser la contrainte de cisaillement. Dans l'artère à débit élevé, une hypertrophie compensatrice est activée par les MAP kinase ERK1/2.

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

# OBJECTIFS DE LA THESE

Le risque cardiovasculaire est non seulement déterminé par les facteurs de risque conventionnels au cours de la vie adulte mais également par une programmation précoce durant la vie fœtale (Barker, 2005). Ainsi, des modifications de l'environnement intra-utérin entraînent une programmation anormale adaptative des fonctions vitales du fœtus. Après la naissance, le changement d'environnement devenu « hostile », va induire le développement progressif de maladies à l'âge adulte.

L'épidémie actuelle d'obésité et de diabète augmente la probabilité de diabète chez la femme enceinte. Qu'il soit pré-gestationnel de type 1 ou de type 2 ou gestationnel, le diabète maternel entraîne des changements définitifs de structure et/ou de fonction des tissus du fœtus en développement et reste, à ce jour, associé à des complications à court mais également à long terme pour la descendance. En effet, de nombreuses études ont montré que les enfants nés de parents diabétiques étaient plus souvent atteints de pathologies cardiovasculaires et d'HTA au cours de la vie adulte (Barker et al., 1989b; Torrens et al., 2009). Mais les altérations de la fonction vasculaire, en cas de reprogrammation fœtale induite par le diabète maternel, aboutissant au développement d'une HTA sont encore mal connues.

Les conséquences d'une exposition *in utero* à un diabète maternel sur la fonction vasculaire de la descendance, ont été étudiées en utilisant un modèle expérimental de rates rendues diabétiques par injection de streptozotocine le premier jour de la gestation (Amri et al., 1999). Ce modèle animal de diabète maternel est caractérisé par des niveaux modérés d'hyperglycémie aboutissant à une gestation normale et à la naissance de rats sains, normotrophes. Dans ce modèle, il a clairement été identifié que l'exposition *in utero* au diabète maternel était un facteur de risque du développement d'une HTA à l'âge adulte. En effet, les petits issus de mère diabétique développent une HTA aux alentours de 6 mois initialement modérée puis d'aggravation progressive pour atteindre une PAS de 200 mmHg à l'âge de 18 mois. Chez ces animaux, une première étude a montré que l'exposition *in utero* au diabète maternel induisait un déficit néphronique congénital et une reprogrammation des transports tubulaires de sodium, conduisant à une anomalie de l'excrétion sodée rénale, pouvant être responsable de cette HTA volo-dépendante (Nehiri et al., 2008). Au cours d'une seconde étude, il a été montré des modifications du profil d'expression génique aortique spécifique des rats issus de mères diabétiques au stade pré-hypertensif (3 mois) avec modifications d'expression de plusieurs acteurs de la voie du métabolisme de l'acide arachidonique, notamment une diminution de l'expression du récepteur à la prostacycline (IP) ayant des effets fonctionnels sur la vasodilatation induite par la PGI<sub>2</sub> au niveau des artères de conductance. Ces perturbations favoriseraient donc une vasoconstriction, pouvant être reliée au développement de l'HTA chez ces animaux (Duong Van Huyen et al., 2010).

Mais le niveau de la pression artérielle étant contrôlé principalement par le réseau microvasculaire, il était intéressant d'étudier les effets de l'exposition *in utero* au diabète maternel sur la reprogrammation de la fonction vasculaire au niveau des artères mésentériques afin de déterminer leur implication dans le développement de l'HTA. Dans ce type d'artères, les débits sanguins locaux sont finement régulés grâce à leur capacité à moduler leur tonus en fonction de la pression, du débit et des besoins tissulaires. Ces artères possèdent un tonus basal résultant de l'interaction entre le tonus myogénique (pression), la dilatation au flux

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

endothélium-dépendante et les systèmes neurohumoraux vasoactifs locaux. D'autre part, toute variation de l'environnement hémodynamique va être perçue au niveau des cellules vasculaires et se traduira par des modifications fonctionnelles et structurales des vaisseaux. En réponse à ces contraintes, le vaisseau est capable de se « restructurer » par une modification de son diamètre ou de l'épaisseur de sa paroi (remodelage artériel) dans le but de normaliser les contraintes de la paroi. Aussi, il était important d'étudier également les mécanismes du remodelage artériel suite à l'exposition *in utero* au diabète maternel afin de mieux appréhender la reprogrammation vasculaire en réponse à des modifications d'environnement fœtal.

Au cours de cette thèse, je me suis donc intéressé :

- 1) aux effets de l'exposition *in utero* au diabète maternel sur la fonction des artères mésentériques de la descendance mâle,
- 2) aux effets de l'exposition *in utero* au diabète maternel sur le remodelage vasculaire induit soit par l'HTA, soit par des variations chroniques de débit sanguin dans les artères élastiques et musculaires de la descendance mâle, ainsi qu'aux modifications des voies de signalisation impliquées dans le remodelage vasculaire,
- 3) à l'étude du dimorphisme sexuel en cas d'exposition *in utero* au diabète maternel.

# MATERIELS ET METHODES



## 1. Modèle animal

Les animaux sont élevés à l'animalerie BNMI (agrément n° B 49007003). Des rates femelles Sprague-Dawley pesant 200-300g sont mises au mâle durant la nuit. Le lendemain matin, des frottis vaginaux sont réalisés. Un frottis positif indique le premier jour de gestation. Puis les rates gestantes sont rendues diabétiques le premier jour de gestation par une injection intrapéritonéale unique de streptozotocine (35mg/kg ip, STZ) préparée dans du tampon citrate (0,4 mol/l, pH 4,4). Les animaux témoins reçoivent, quant à eux, une quantité équivalente de tampon citrate. L'état diabétique est vérifié chez les rates en mesurant leur glycémie sur une goutte de sang prélevée à la queue (AccuChek®, Roche). Seules les rates dont la glycémie est comprise entre 15 et 25 mmol/l sont incluses dans l'étude. Ce statut diabétique est vérifié tous les 2 jours jusqu'à la mise bas. A la naissance, les rats mâles et femelles issus de mères diabétiques (DMO) ou de mères contrôles (CMO) sont pesés, et chaque portée est réduite à 10 animaux. Tous les animaux sont maintenus dans une pièce contrôlée pour la température (21°C) et la lumière (cycle de 12h de lumière). Ils ont libre accès à la nourriture et l'eau jusqu'à expérimentation (3 et 18 mois).

Tous les projets suivants ont reçu l'avis favorable du CEEA des Pays de Loire (CEEA 2011.42 du 23 novembre 2011 et dossier 00960.02 du 24 janvier 2014 renouvelé le 27 janvier 2016).

## 2. Mesure de la pression artérielle chez l'animal vigile

La pression artérielle est mesurée chez l'animal vigile soit par cathéter placé au niveau de l'artère fémorale, soit par pléthysmographie.

La pression artérielle sanglante est mesurée à l'aide d'un cathéter (PE50 soudé à du PE10, DI : 0,28mm, DE : 0,61 mm, Biotrol) placé dans l'artère fémorale droite sous anesthésie. Après cannulation, le cathéter artériel est glissé sous la peau et extériorisé dans la région inter-scapulaire du rat et est rempli d'une solution de polyvinylpyrrolidone (PVP) à 40% (Prolabo) hépariné (100UI/ml) pour éviter que le cathéter ne se bouche. Trois jours après l'opération, le cathéter est relié à un capteur de pression lui-même relié à un système d'acquisition permettant l'enregistrement de la pression artérielle continue pulsatile.

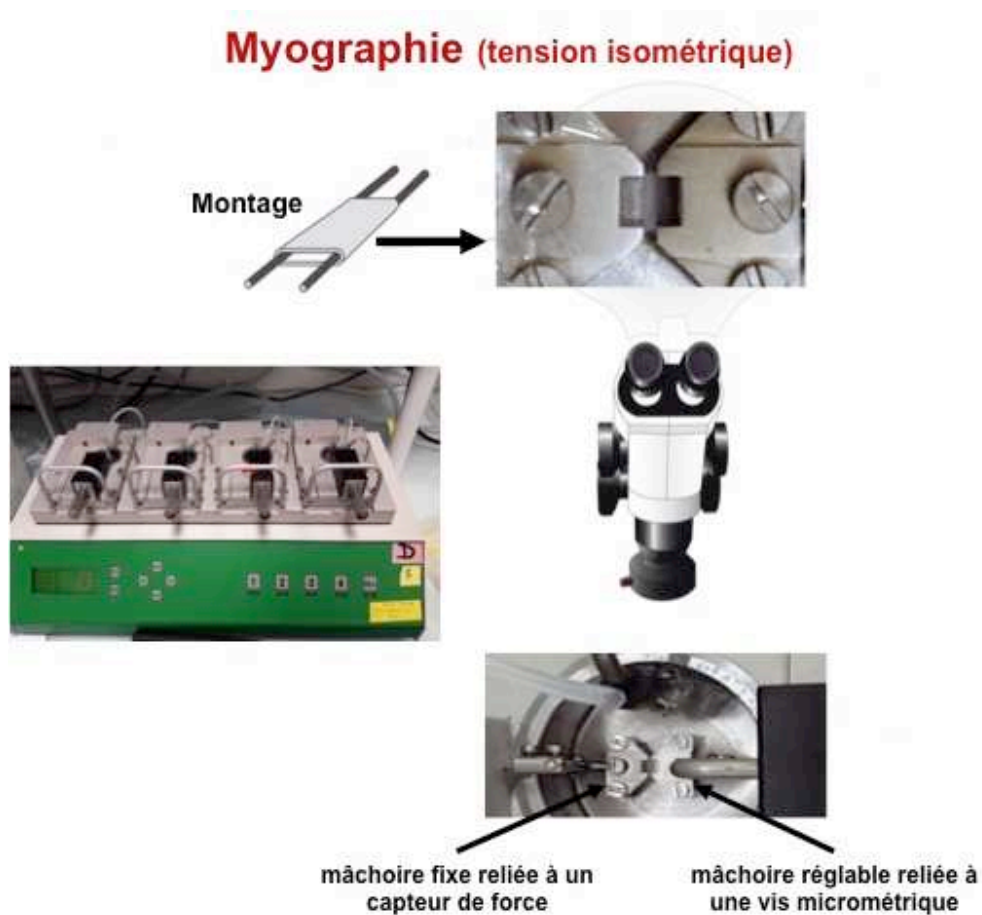
La mesure par pléthysmographie est réalisée grâce à un manchon caudal placé sur la queue de l'animal (système BP-2000, Viositech, Bioseb). Ce système est basé sur la photo-pléthysmographie transmissive, où les variations lumineuses transmises au travers de la queue constituent le signal de base analysé pour déterminer la pression vasculaire et la fréquence cardiaque. À chaque battement du cœur, une onde de pression se déplace dans le système vasculaire. Lorsqu'elle atteint la queue de l'animal, les vaisseaux se dilatent légèrement, ce qui occasionne une augmentation de la diffraction lumineuse (correspondant à la systole). Après le passage de l'onde, les vaisseaux de la queue se contractent et la pression diminue, ce qui occasionne une réduction de la diffraction lumineuse (correspondant à la diastole).

Pour une bonne qualité, fiabilité et reproductibilité des mesures, celles-ci ont été répétées pendant 2 semaines, la première semaine servant de période d'habituation aux animaux.

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

### 3. Myographie

La réactivité vasculaire basale de segments d'artères mésentériques a été étudiée chez des animaux âgés de 3 et 18 mois. Après euthanasie, le mésentère est prélevé dans une solution physiologique dont la composition est la suivante: NaCl 130mM, KCl 3,7mM, MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 1,2mM, NaHCO<sub>3</sub> 14,9mM, CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) 1,6mM, HEPES 5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM et D glucose 11mM. Les artères mésentériques sont ensuite dégraissées puis chaque segment de 2mm de long est monté dans les cuves d'un myographe de Mulvany (DMT). Un premier fil de tungstène de 40µm de diamètre est inséré à l'intérieur de l'artère et fixé à une mâchoire, elle-même reliée à un transducteur permettant de mesurer la tension. Un second fil est ensuite inséré et fixé à une seconde mâchoire, reliée à une visse micrométrique permettant de régler l'écartement entre les deux mâchoires et donc les forces appliquées sur les parois (tension isométrique) (Figure 19).



**Figure 19:** Technique de myographie (appareil et montage).

Une première étape de prétension est réalisée par palier jusqu'à obtenir une tension équivalente à 90 mmHg. Après 45 minutes de repos, l'état fonctionnel de l'artère est vérifié par 3 tests successifs avec une solution riche en potassium (80mM, permet de vérifier l'état fonctionnel du muscle lisse du vaisseau indépendamment de l'endothélium), puis après lavage et 10 minutes de repos, une contraction à la phényléphrine (Phe, 10<sup>-6</sup> M,

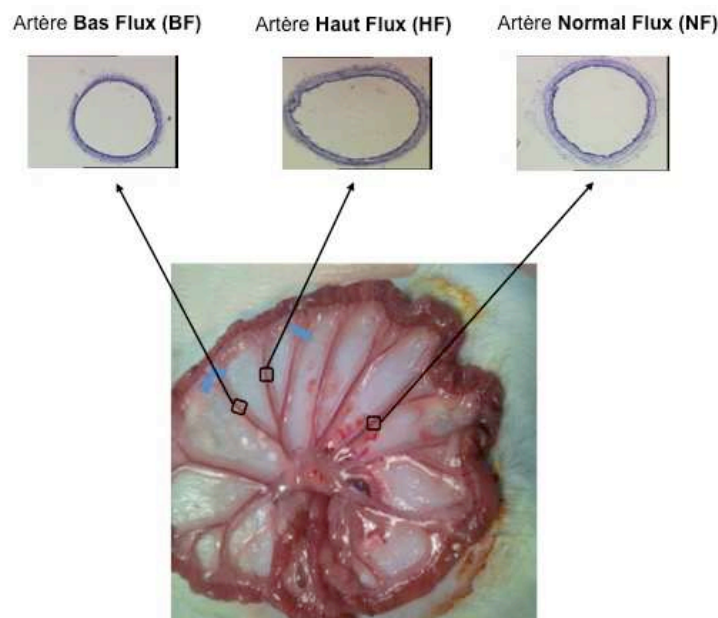
**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

agoniste  $\alpha$ 1-adrénergique, permet de vérifier l'état fonctionnel du muscle lisse du vaisseau en passant par l'endothélium), suivie d'une dilatation à l'acétylcholine ( $10^{-6}$  M, agoniste M2-muscarinique, permettant de vérifier la viabilité de l'endothélium). Après un repos de 20 minutes, les différentes courbes doses réponses sont ensuite réalisées :

- courbe dose réponse de contraction à la Phe  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M
- courbe dose réponse de dilatation à l'ACh  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M
- courbe dose réponse de dilatation au beraprost (analogue de la PGI<sub>2</sub>)  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M
- courbe dose réponse de dilatation au SNP  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M

#### 4. Ligature des artères mésentériques

Les mécanismes de remodelage des artères de résistance en réponse à des variations de flux ont été étudiés au niveau des artères mésentériques de rats CMO et DMO âgés de 3 mois. Le rat est opéré sous anesthésie (induction : isoflurane 5% et débit d'air de 2L/min puis maintien : isoflurane 2,5%). Une fois le mésentère externalisé, des ligatures (nœud simple, fil de suture 7-0) sont réalisées sur les branches de 2<sup>nd</sup> ordre entraînant une baisse de flux dans l'artère de 1<sup>er</sup> ordre correspondante (bas flux, BF), (Figure 20). L'artère située entre les deux artères ligaturées voit son flux augmenter (haut flux : HF) pour lui permettre d'irriguer correctement les tissus en liaison avec les artères ligaturées. Les artères situées à distance des ligatures ont des flux non perturbés et sont utilisées comme artères de contrôle (flux normal, NF). Une fois les ligatures réalisées, le mésentère est replacé dans la cavité abdominale puis l'abdomen est refermé avec suture indépendante du plan musculaire et du plan épidermique (fil de suture 4-0).



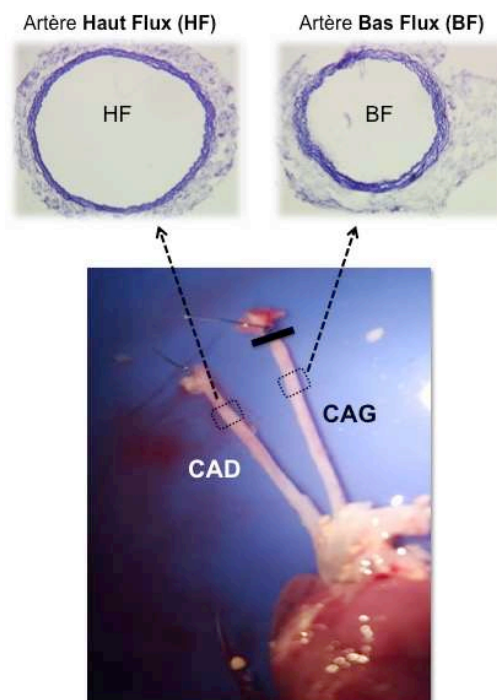
**Figure 20:** Montage photo montrant l'emplacement de chaque ligature (tirets bleus) ainsi que le résultat des variations chroniques de flux sur des coupes d'artères mésentériques après coloration à l'orcéine.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

Deux groupes d'animaux seront réalisés pour permettre d'étudier le remodelage soit après 7 jours de ligatures ou soit après 21 jours de ligature. Les mésentères seront étudiés par artériographie (étude du diamètre passif) puis par histomorphométrie. Deux jeux de ligatures sont réalisés sur chaque mésentère, un jeu permettant l'étude du diamètre passif et le second prélevé pour des études biochimiques et conservé, après prélèvement à -80C°.

## 5. Ligature carotidienne

Les mécanismes de remodelage des artères de conductance en réponse à des variations de flux ont été étudiés au niveau des carotides de rats CMO et DMO âgés de 3 mois. Les animaux sont opérés sous anesthésie de la même manière que lors des ligatures des artères mésentériques. Des ligatures (nœud double, fil de suture 4-0) ont été réalisées sur la branche commune de la carotide gauche, entraînant une baisse de flux dans l'artère (BF) qui induit un remodelage constrictif. A l'opposé, la carotide droite non ligaturée subit une augmentation chronique de flux sanguin induisant un remodelage expansif (Figure 21). Le remodelage développé sera étudié 30 jours après la ligature par histomorphométrie.



**Figure 21:** Montage photo montrant l'emplacement de la ligature sur la carotide gauche (CAG ; emplacement précisé par un tiret noir) ainsi que le résultat des variations chroniques de flux sur des coupes de carotide après coloration à l'orcéine ; la ligature de la carotide gauche entraîne une baisse de flux (bas flux, BF). La carotide droite (CAD) non ligaturée est désignée comme artère haut flux (HF).

## 6. Artériographie

L'artériographie permet l'étude de la réactivité vasculaire en réponse à des variations de pression ou de flux. Le tonus myogénique et le diamètre passif de segments d'artères mésentériques ont été étudiés chez des animaux âgés de 3 et 18 mois. Une fois l'animal euthanasié, le mésentère est prélevé dans une solution physiologique dont la composition est la suivante: NaCl 130mM, KCl 3,7mM, MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 1,2mM, NaHCO<sub>3</sub> 14,9mM, CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) 1,6mM, HEPES 5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM et D glucose 11mM. Les artères mésentériques sont ensuite dégraissées et montées entre deux pipettes de verre reliées à 2 pompes peristaltiques permettant de faire varier le flux ou la pression à l'intérieur du vaisseau. Une camera reliée à un ordinateur permet de mesurer les variations de diamètre du vaisseau en réponse à des variations de flux ou de pression. Une fois montée, l'artère est mise sous pression à 75 mmHg (pression physiologique). L'état des cellules musculaires lisses ainsi que des cellules endothéliales est vérifié par des tests successifs de contraction au KCL, à la Phe puis à l'ACh, comme pour la myographie. Les mesures de pression et de diamètre ont été recueillies à l'aide d'un système d'acquisition de données Biopac (Biopac MP100 couplé au logiciel Acqknowledge) (Figure 22).

### 6.1. Tonus myogénique

La pression de base de l'artère est fixée à 10 mmHg. Des paliers successifs de pression sont ensuite appliqués (10, 25, 50, 75, 100 et 125 mmHg) permettant de mesurer le tonus actif du vaisseau. Le diamètre du vaisseau est mesuré à chaque palier de pression. Le tonus myogénique est la différence entre le diamètre passif de l'artère et son tonus actif.

### 6.2. Diamètre passif

La solution physiologique saline est remplacée par une solution physiologique saline **sans calcium** entraînant la mort du vaisseau (NaCl 130mM, KCl 3,7mM, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 1,2mM, NaHCO<sub>3</sub> 14,9mM, EGTA 2mM, HEPES 5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM et D -glucose 11mM). Les artères sont alors mises à une pression de 75 mmHg et incubées en présence de SNP 10<sup>-5</sup> M et de papavérine 10<sup>-4</sup> M pendant 20 min afin de dilater au maximum le vaisseau. Les paliers successifs de pression (10, 25, 50, 75, 100 et 125 mmHg) sont à nouveau appliqués avec une mesure de diamètre à chaque palier. Une fois les mesures terminées, la pression est redescendue à 75 mmHg et l'artère est fixée dans du para-formaldéhyde (PFA) 4 % pH 7,4 pendant 30 minutes. Les artères sont ensuite incluses dans de l'OCT par des vapeurs d'azote liquide et conservées à -80C° pour analyses histomorphométriques.

## Artériographie (tension isobarique)

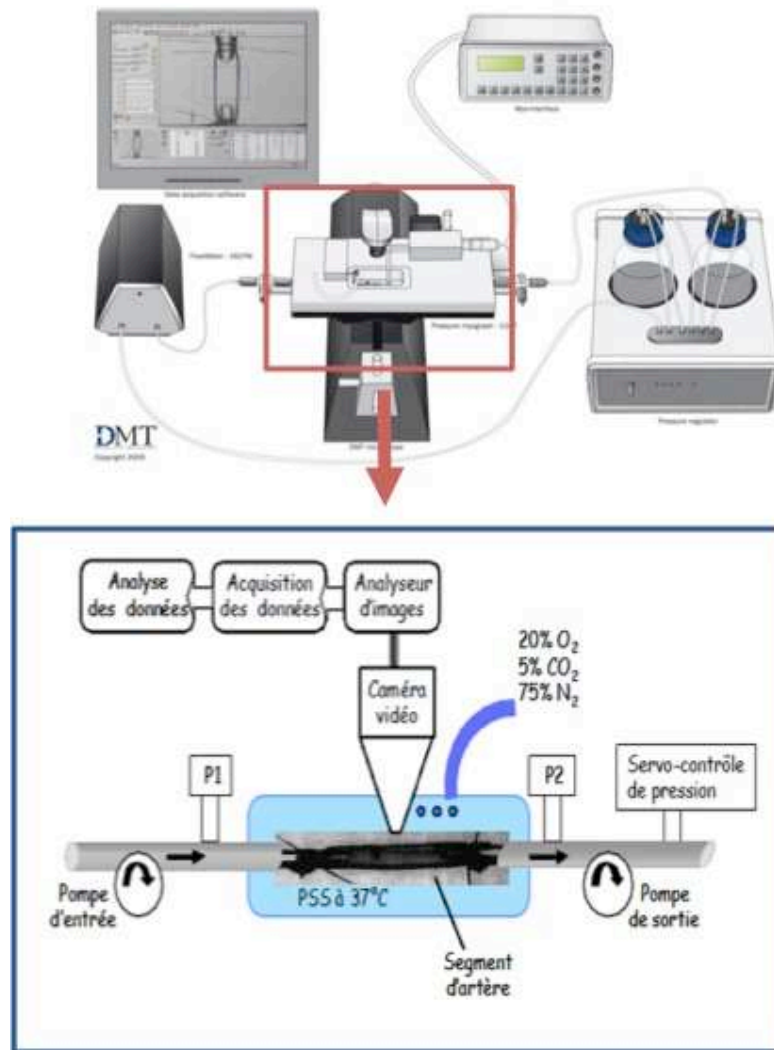


Figure 22: Principe de l'artériographie (appareil et montage).

## 7. Histomorphométrie

Après inclusion dans de l'OCT (Optimal Tissue Compound, Tissue-Teck, VWR), les cupules sont trempées dans un bain d'isopentane refroidi afin de solidifier l'OCT de façon douce et permettant ainsi de conserver les structures des vaisseaux au maximum. Chaque échantillon est ensuite conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Des coupes transversales de  $7\ \mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Cryocut Leica CM3050 S, Leica Biosystems). Les coupes sont ensuite placées sur des lames Superfrost Ultraplus (Thermo Fisher Scientific) permettant une adhérence maximale des coupes.

Chaque lame est ensuite colorée à l'orcéine (coloration des fibres d'élastine en rose) et à l'eau lithinée (coloration des noyaux en bleu). La solution d'orcéine est composée de 1g d'orcéine (Sigma), 100ml d'éthanol

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

70%, 0,6ml d'HCl concentré. La solution d'eau lithinée est obtenue en saturant de l'eau stérile par du carbonate de lithium et en filtrant la préparation.

Les lames sont plongées dans des bains successifs :

- 10 min dans la solution d'orcéine
- 2 fois 1 min dans de l'eau stérile pour le rinçage
- 1 min dans de l'eau lithinée
- 2 min dans de l'eau stérile pour le rinçage
- 5 min dans de l'éthanol absolu pour la déshydratation
- 3 fois 1 min dans du Toluène

Une fois sèches, les coupes sont montées entre lame et lamelle par 3 gouttes de milieu de montage DPX. Après acquisition d'images à l'aide d'une caméra reliée à un microscope (Olympus T100 microscope, caméra Sony), les périmètres interne et externe de la média et la surface cross-sectionnelle de la média (MCSA) sont mesurés ; le rapport surface média/surface lumière (M/L) ainsi que les diamètres interne et externe sont calculés. L'analyse est effectuée grâce au logiciel Image J.

## 8. Rein isolé perfusé

Le rat est placé sous anesthésie (induction : isoflurane 5% et débit d'air de 2L/min puis maintien : isoflurane 2,5%). Après laparotomie, le système intestinal de l'animal est extériorisé. L'aorte abdominale, les artères rénales, l'artère mésentérique supérieure et la veine cave inférieure sont nettoyées du tissu conjonctif environnant. Le rein est dégagé et le carrefour de l'aorte abdominale avec l'artère rénale est minutieusement disséqué sous loupe. L'aorte abdominale est ensuite incisée (coupe de 45 degrés couvrant les 2/3 de la lumière du vaisseau). Un cathéter est alors inséré et remonté jusqu'à l'artère rénale (Weiss et al., 1959). Le cathéter (PE50/PE20, FMD) est maintenu en place par une ligature située au niveau de l'aorte abdominale. Le rein perfusé par une solution de Krebs (selon (El-Mas et al., 2003)) est prélevé avec soin et placé dans une chambre à organe chauffée (Boesen and Pollock, 2007), le système étant relié à 1 pompe peristaltique permettant de perfuser le rein à des débits donnés. La pression de perfusion rénale est alors mesurée grâce à un capteur de pression reliée à un logiciel d'acquisition (Acqknowledge).

Après 30 à 45 minutes, la viabilité du rein est ensuite testée par le déclenchement d'une contraction à la phényléphrine ( $10^{-7}$  M), suivie d'une dilatation à l'acétylcholine ( $10^{-6}$  M). Après un repos de 15 minutes, différentes courbes dose-réponse sont réalisées à un débit physiologique de 5 ml/min :

- courbe dose-réponse de dilatation à l'ACH  $10^{-9}$  M à  $3 \cdot 10^{-5}$  M
- courbe dose-réponse de dilatation au beraprost (analogue de la PGI<sub>2</sub>)  $10^{-12}$  M à  $3 \cdot 10^{-8}$  M
- courbe variation de pression en fonction du débit (sans cacl2 + 100µL SNP + 10µL papavérine pour dilater au maximum le système vasculaire rénal)

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



## 9. Activité Transglutaminase

L'activité tTG des artères mésentériques est mesurée sur vaisseau entier. Après euthanasie, le mésentère de l'animal est prélevé rapidement puis disséqué et dégraissé. Les segments d'artères mésentériques sont ensuite incubés pendant 24 heures à 37°C dans 100 µl de tampon composé de milieu de Leibovitz avec 10% de Sérum Fœtal Bovin (Gibco), un mélange d'une solution antibiotique/antimycotique 1% (Gibco), de la cadavérine marquée à l'AlexaFluor594 (10 µmol/L, Invitrogen), du Dapi (5 µg/ml, Molecular probes), soit en présence de SNP ( $10^{-3}$  mol/L), soit de DTT (2 mmol/L, Sigma) ou des 2. Le DTT est utilisé comme agent activateur permettant la translocation de la tTG et ainsi son activation. Le SNP, donneur de NO, est utilisé comme inhibiteur de l'activité tTG. L'activité basale est observée sur des coupes sans DTT. Les vaisseaux sont ensuite montés entre lame et lamelle pour observation en microscopie confocale (Nikon Eclipse TE2000S) ; la fluorescence émise, qui représente l'activité de la tTG, est mesurée par le logiciel Image J.

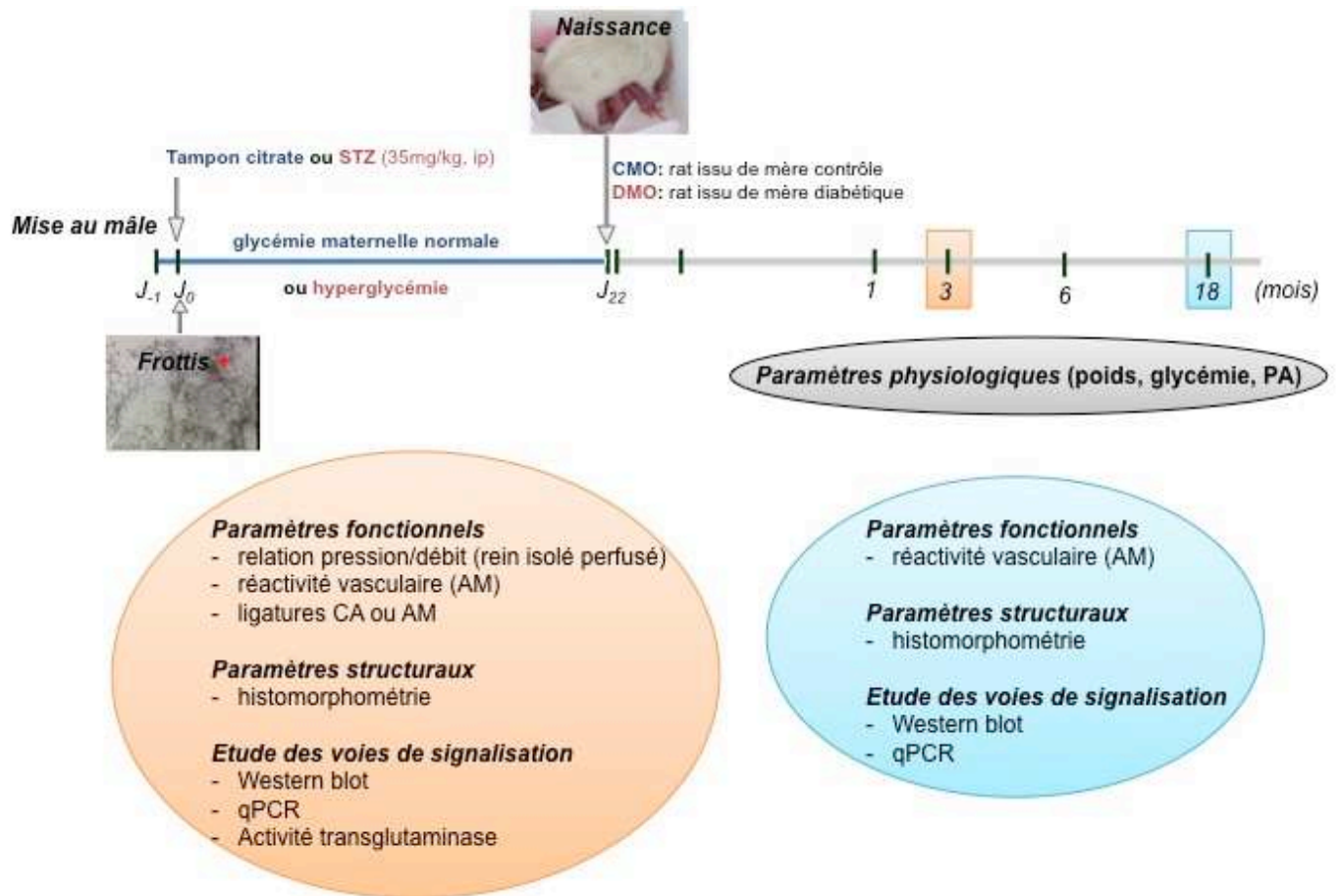
L'activité tTG au niveau des carotides est réalisée sur des coupes de carotide fixées. Les coupes sont dans un premier temps réhydratées pendant 5 minutes dans du PBS, puis saturées dans du PBS-BSA 5%. Les coupes sont ensuite recouvertes de 100µl de tampon contenant du milieu de Leibovitz avec 10% de Sérum Fœtal Bovin (Gibco), un mélange d'une solution antibiotique/antimycotique 1%, de la cadavérine marquée à l'AlexaFluor594 (10 µmol/L), du Dapi (5 µg/ml) et du DTT (2 mmol/L). L'activité basale est observée sur des coupes sans DTT.

## 10. Analyse statistique

Les tests ont été réalisés avec un risque p de 5%. La significativité de la variance entre les différents échantillons a été déterminée par ANOVA à deux facteurs pour les courbes. Pour les autres analyses, des tests non paramétriques ont été utilisés. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.

## 11. Plan d'expérimentation





**Figure 23:** Plan expérimental retraçant les différentes études. Les paramètres gris correspondent aux études effectuées longitudinalement ; les paramètres orange correspondent aux études réalisées chez les DMO et les CMO âgés de 3 mois ; les paramètres bleus correspondent aux études réalisées chez les DMO et les CMO âgés de 18 mois ; AM : artères mésentériques, CA : carotide, PA : pression artérielle.

# RESULTATS

## **Première Partie: Effets de l'exposition *in utero* au diabète maternel sur la fonction des artères mésentériques chez le mâle**

1<sup>er</sup> article : **"Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed *in Utero* to Maternal Hyperglycaemia"**

Emilie Vessières, **Abdallah Dib**, Jennifer Bourreau, Eric Lelièvre, Marc-Antoine Custaud, Martine Lelièvre-Pégorier, Laurent Loufrani, Daniel Henrion and Céline Fassot

PLoS One, 2016 ; 11:e0146830

## Contexte scientifique

Comme pour toute autre espèce vivante, la croissance et la santé de l'homme dépendent du milieu dans lequel il évolue. La période fœtale et la très jeune enfance sont certainement les périodes de plus grande adaptabilité mais aussi de plus grande vulnérabilité face à cet environnement. Depuis une vingtaine d'années, des preuves convergentes suggèrent que cette adaptabilité pourrait avoir des conséquences néfastes affectant le développement et la santé des enfants et des adultes à long terme. Plusieurs modèles animaux tels que la modification de la nutrition maternelle, la réduction de la circulation utéro-placentaire, ou l'utilisations de traitements comme les glucocorticoïdes ont mis en évidence un lien étroit entre environnement fœtal et programmation de l'HTA à l'âge adulte en montrant que des changements rénaux ou des modifications de la régulation des hormones étaient impliqués (McMillen and Robinson, 2005; Nehiri et al., 2008; Vehaskari and Woods, 2005). Indépendamment du mécanisme rénal, l'HTA pourrait être, en partie, due à une programmation fœtale entraînant une altération de la structure et/ou de la fonction vasculaire (Ghulmiyyah et al., 2011; Gomes and Gil, 2011; Jones et al., 2012; Lamireau et al., 2002; Rodford et al., 2008) . Les troubles métaboliques et l'HTA sont de plus en plus associés à l'exposition *in utero* au diabète maternel (Gomes and Gil, 2011; Wright et al., 2009).

Dans notre laboratoire, un modèle d'exposition du fœtus au diabète maternel a été développé chez la rate gestante, induit par une simple injection de STZ (35 mg/kg, ip) au 1<sup>er</sup> jour de gestation. Il est caractérisé par des niveaux modérés d'hyperglycémie maternelle pendant toute la durée de la gestation aboutissant à une gestation normale, et à la naissance de rats sains et normotrophes. Ces animaux issus de mères diabétiques (DMO) développent de nombreuses anomalies dont une réduction définitive du capital néphronique de 30% (Amri et al., 1999; Duong Van Huyen et al., 2003) et une HTA dès l'âge de 6 mois ( $165 \pm 5$  mmHg \*\*\* vs  $139 \pm 3$  mmHg) progressant avec l'âge (Nehiri et al., 2008). Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une relation entre un déficit néphronique et le développement d'une HTA à l'âge adulte (Hughson et al., 2006; Ingelfinger and Woods, 2002; Keller et al., 2003). Pourtant, l'étude de réactivité des aortes chez les DMO issus des mères diabétiques âgés de 3 mois (stade pré-hypertensif) a montré une altération spécifique de la vasodilatation induite par un analogue de la PGI<sub>2</sub>, associée à une réduction du nombre de récepteurs à la prostacycline (récepteur IP) de 50% (aussi bien au niveau messenger que protéique) (Duong Van Huyen et al., 2010). Ces résultats ont donc mis en lumière une reprogrammation de la fonction vasculaire induite par l'exposition *in utero* au diabète maternel qui pourrait être impliquée dans le développement de l'HTA observée chez ces animaux.

Alors que la PGI<sub>2</sub> n'a qu'un faible rôle dans le maintien du tonus des grosses artères, son rôle est majeur dans le maintien du tonus vasculaire au niveau des artères de résistance (Fetalvero et al., 2006; Joannides et al., 1995). Aussi, cette première étude s'est intéressée aux effets du diabète maternel sur la fonction des artères mésentériques. Nous avons donc cherché à déterminer si l'hyperglycémie maternelle pendant la grossesse pouvait affecter le tonus vasculaire de l'artère de résistance dès le stade pré-hypertensive (3 mois) et plus tard dans la vie (18 mois), en émettant l'hypothèse que la programmation fœtale du tonus vasculaire

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

pourrait influencer sur la régulation de la pression artérielle chez les DMO par une altération de l'équilibre entre les réponses vasodilatatrices et vasoconstrictrice.

## Résultats majeurs

Ces travaux ont permis de montrer, chez les mâles issus de mères diabétiques, des anomalies de réactivité vasculaire des artères mésentériques, associées à des perturbations des voies de transduction du signal et ce dès le stade pré-hypertensif. Concernant les systèmes vasodilatateurs, nous observons une diminution protéique précoce du récepteur IP mais également de la peNOS aussi bien à 3 mois qu'à 18 mois. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec les résultats de réactivité vasculaire montrant non seulement une diminution de réponse à la prostacycline mais également une dysfonction endothéliale plus tardive. Concernant les systèmes vasoconstricteurs, nous observons une augmentation de l'activité contractile des cellules musculaires lisses à 18 mois, en relation avec le maintien d'un tonus myogénique élevé. En effet, nous avons trouvé un accroissement du rapport pMLC/MLC associé à une augmentation de l'activité RhoA et PKA chez les rats âgés issus de mères diabétiques.

**Cette étude met donc en évidence une reprogrammation de la fonction vasculaire chez les rats issus de mères diabétiques, en faveur d'un phénotype vasoconstricteur, qui pourrait être impliquée dans le développement de l'HTA observée chez ces animaux.**

RESEARCH ARTICLE

# Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed *In Utero* to Maternal Hyperglycaemia

Emilie Vessières<sup>1,2</sup>, Abdallah Dib<sup>1</sup>, Jennifer Bourreau<sup>1</sup>, Eric Lelièvre<sup>1</sup>, Marc-Antoine Custaud<sup>1,3</sup>, Martine Lelièvre-Pégorier<sup>4</sup>, Laurent Loufrani<sup>1,3</sup>, Daniel Henrion<sup>1,2,3</sup>, Céline Fassot<sup>1\*</sup>

**1** CNRS UMR 6214, INSERM U1083, University of Angers, Angers, France, **2** Cardiovascular Functions In Vitro (CARFI) platform, Angers, France, **3** University Hospital (CHU) of Angers, Angers, France, **4** INSERM U872, Cordeliers Research Center, University of Pierre and Marie Curie, and University of Paris-Descartes, Paris, France

\* [celine.fassot@inserm.fr](mailto:celine.fassot@inserm.fr)



## Abstract

Epidemiologic studies have demonstrated that cardiovascular risk is not only determined by conventional risk factors in adulthood, but also by early life events which may reprogram vascular function. To evaluate the effect of maternal diabetes on fetal programming of vascular tone in offspring and its evolution during adulthood, we investigated vascular reactivity of third order mesenteric arteries from diabetic mother offspring (DMO) and control mother offspring (CMO) aged 3 and 18 months. In arteries isolated from DMO the relaxation induced by prostacyclin analogues was reduced in both 3- and 18-month old animals although endothelium (acetylcholine)-mediated relaxation was reduced in 18-month old DMO only. Endothelium-independent (sodium nitroprusside) relaxation was not affected. Pressure-induced myogenic tone, which controls local blood flow, was reduced in 18-month old CMO compared to 3-month old CMO. Interestingly, myogenic tone was maintained at a high level in 18-month old DMO even though agonist-induced vasoconstriction was not altered. These perturbations, in 18-months old DMO rats, were associated with an increased pMLC/MLC, pPKA/PKA ratio and an activated RhoA protein. Thus, we highlighted perturbations in the reactivity of resistance mesenteric arteries in DMO, at as early as 3 months of age, followed by the maintenance of high myogenic tone in older rats. These modifications are in favour of excessive vasoconstrictor tone. These results evidenced a fetal programming of vascular functions of resistance arteries in adult rats exposed *in utero* to maternal diabetes, which could explain a re-setting of vascular functions and, at least in part, the occurrence of hypertension later in life.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Vessières E, Dib A, Bourreau J, Lelièvre E, Custaud M-A, Lelièvre-Pégorier M, et al. (2016) Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed *In Utero* to Maternal Hyperglycaemia. PLoS ONE 11(1): e0146830. doi:10.1371/journal.pone.0146830

**Editor:** Bertrand Blondeau, INSERM UMRS 1138, FRANCE

**Received:** October 22, 2015

**Accepted:** December 22, 2015

**Published:** January 12, 2016

**Copyright:** © 2016 Vessières et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by research grants from SFD (Francophone Society of Diabetes), the "Fondation de France" (no. 2008002726) and "Région des Pays de La Loire ART no. 2011-12354".

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.



## Introduction

The concept of “fetal programming” is defined as the process whereby an adverse *in utero* environmental stimulus during the critical period of development can induce cardiovascular diseases during adulthood [1]. Epidemiological studies have clearly demonstrated that changes in the intra-uterine environment during specific windows of fetal development are significant causes of fetal stress [2,3], leading to loss of structure/function and pre-emptive adaptations to an adverse post-natal environment [4]. The mechanisms by which these alterations occur are not fully understood but they can include: 1) permanent structural changes in organs; 2) epigenetic modifications and 3) permanent effects on the regulation of cellular ageing [5].

Environmental perturbations during pregnancy predispose offspring to altered vascular function, leading to hypertension [6,7,8,9] and cardiovascular disease later in life [10]. It is well known that the vascular tone of small arteries (i.e. mesenteric arteries) is the main determinant of arterial resistance and ultimately of arterial pressure. Vascular tone is defined as blood vessel response by vasodilation or vasoconstriction to external stimuli in order to regulate transmural pressure [11]. In resistance arteries, endothelium-dependent vasodilation, mediated by a combination of several vasoactive substances including nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), acts directly to reduce vascular tone [12,13]. Conversely, myogenic tone (MT) is a contraction of small resistance arteries in response to increased intraluminal pressure [11]. This response is independent of neural, metabolic, and hormonal influences but directly implicates smooth muscle cells with dynamic remodelling of actin cytoskeleton and actin polymerization [14]. In addition, myosin light chain (MLC) phosphorylation, filamin and profilin are key regulators of the dynamic reorganization of actin filaments [15,16]. Thus equilibrium between MT and dilation allows efficient control of local blood flow and arterial pressure through its effect on vascular calibre in peripheral tissues. Studies using models of animals exposed *in utero* to maternal diabetes or obesity have shown the occurrence of endothelial dysfunction in large and resistance arteries [17,18,19]. These vascular perturbations have only been linked to alterations in the NO pathway [20,21,22,23]. However, in an experimental model of *in utero* exposure to moderate maternal hyperglycaemia, our group has demonstrated that, prior to hypertension development [24], the aortae of offspring (DMO, 3 months old) of young diabetic mothers, showed a specific alteration of PGI<sub>2</sub>-induced vasodilation linked to a functional reduction in prostacyclin receptor (IP receptor) activity [25]. As studies seem to focus on unbalanced vascular tone due to vasodilation perturbations, little is known about vasoconstrictor pathways involved in the control of vascular tone.

In this study, we aimed to determine whether maternal hyperglycaemia during pregnancy could affect resistance artery tone in offspring at a pre-hypertensive stage and later in life. We hypothesize that fetal programming of vascular tone could impact the regulation of arterial pressure in DMO through an impaired balance between vasodilator and vasoconstrictor responses.

## Research Design and Methods

### Animals

Pregnant Sprague–Dawley rats, weighing 250–300g, were made diabetic on day 0 of gestation by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma, 35mg/kg), as previously described [25]. The diabetic state was checked in fasted rats by measuring the plasma glucose concentration (AccuChek®, Roche) in their tail blood. Only pregnant females whose plasma glucose ranged between 15 and 25mmol/l were included in the study. This diabetic status was confirmed every two days until delivery. On the day of delivery, the newborn rats were

weighed. Each litter was then reduced to 10 pups. All animals were kept in a temperature and light controlled room, at 21°C with a 12 hour light cycle. They had ad libitum access to food (SDS Laboratory) and tap water. Eight to fourteen different litters of DMO and CMO were used for the entire study. After weaning, males from each litter were split into 4 different groups: 2 groups for blood pressure measurements and 2 groups for vascular tone measurements. For each type of measurement, there was one group of 3-month old and one group of 18-month old rats. Each experiment was performed on animals from at least 3 different litters, (taking into account that the same litters are represented in each group of experiments). All experiments were conducted in accordance with the institutional guidelines and the recommendations for the care and use of laboratory animals as put forward by the French Ministry of Agriculture. The protocol was approved by the Ethic Committee of "Pays de Loire" (permit # CEEA.2011.42).

### Arterial blood pressure measurements

Blood pressure (BP) was measured in conscious CMO and DMO at 3 and 18 months of age as previously described [25]. In short, animals were anesthetized using sodium pentobarbital anaesthesia (60mg/kg, i.e.; Sanofi) and an arterial catheter (PE-50 fused to PE-10; internal diameter of 0.28mm, and external diameter of 0.61mm) was inserted into the femoral artery. Upon regaining consciousness, animals were housed in individual cages. After 3 days of recovery, BP was recorded in conscious unrestrained animals over a period of 30 minutes. The arterial catheter was connected to a pressure transducer (P10EZ, Becton Dickinson), linked with a Gould RS 3400 polygraph in order to continuously measure pulsatile BP.

### Vascular function of resistance arteries

Vascular function was assessed in isolated mesenteric arteries of 3 and 18-month old rats.

**Pharmacological study.** contraction and vasodilation of isolated mesenteric arteries was assessed in response to KCl (80mM) and cumulative dose-response curves of phenylephrine (PE), acetylcholine (Ach, endothelium-dependent vasodilator), sodium nitroprusside (SNP, endothelium independent vasodilator) and beraprost (PGI<sub>2</sub> analogue, endothelium-derived vasodilator). Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (PE, Ach and SNP) and Cayman (beraprost). Arterial segments (2mm long) were dissected and mounted on a wire-myograph (Danish MyoTechnology, DMT) as previously described [26]. Briefly, 2 tungsten wires (25µm diameter) were inserted into the lumen of the artery and fixed respectively to a force transducer and a micrometer. Arteries were bathed in a 5ml organ bath containing a physiological salt solution (PSS) maintained at a pH of 7.4, a pO<sub>2</sub> of 160mmHg and a pCO<sub>2</sub> of 37mmHg. After wall tension normalization, arteries were allowed to stabilize for 30 minutes. Endothelial integrity was assessed after pre-contraction with 10<sup>-6</sup>M PE by evaluating the vasodilator effect of 10<sup>-6</sup>M Ach. Endothelium-independent relaxation to SNP was obtained at the end of the protocol. Cumulative concentration-response curve to Ach, SNP and beraprost were performed after PE-induced pre-contraction (10<sup>-6</sup>M). Data were expressed as a % relaxation of PE-induced pre-contraction.

**Study of pressure-dependent tone.** mesenteric arteries were cannulated at both ends in a video-monitored perfusion system (LSI) as previously described [27]. Briefly, third order arteries were bathed in a physiological salt solution (pH 7.4, PO<sub>2</sub> 160mmHg, PCO<sub>2</sub> 37mmHg). Pressure was controlled by a servo-perfusion system. Pressure was increased little by little from 10 to 125mmHg without intraluminal flow [28]. At the end of each experiment, arterial segments were superfused with a Ca<sup>2+</sup>-free physiological salt solution containing ethylenbis-(oxyethylene-nitrolo) tetra-acetic acid (EGTA; 2mM), papaverin (10<sup>-4</sup>M) and SNP (10<sup>-5</sup>M); then pressure



steps were repeated to determine the passive diameter of the arteries [29]. Results are given in micrometres for artery diameter. Myogenic tone was expressed as the percentage of passive diameter (measured diameter/passive diameter $\times$ 100).

### Histomorphometry analysis

Morphological studies were performed on mesenteric arteries fixed in 4% buffered formaldehyde and embedded in OCT. Sections (7 $\mu$ m) were stained with orcein for elastic fibre detection in order to measure histomorphometric parameters. Internal and external media perimeters, intima-media thickness and medial cross-sectional area were determined after image acquisition (Nikon Eclipse E600 microscope, Sony camera), and analysed using ImageJ software (NIH).

### Blood parameters

Before sacrifice, glycaemia was quantified in fed animals, on a sample of arterial blood with a glucometer. Serum blood level of 6-keto-PGF1 $\alpha$ , a stable metabolite of PGI $_2$ , was measured in CMO and DMO, using a commercially available kit (Cayman).

### Western blot analysis of protein expression

Western blot analysis of proteins of interest was performed following previously described techniques [30]. Briefly, mesenteric arteries were rapidly dissected and frozen in order to maintain their *in vivo* activity (phosphorylated targets). Proteins were extracted and the total protein content was determined by the Bradford technique [31] in order to file equal amounts (15 $\mu$ g) of the denatured proteins. Membranes were incubated with polyclonal antibodies directed against MLC, phosphorylated MLC (pMLC), filamin-1, profilin-1, P38 MAP kinase (P38), phosphorylated P38 (pP38), protein kinase A (PKA), phosphorylated PKA (pPKA), RhoA and IP receptor. The detection was performed by chemiluminescence emitted from luminol oxidized by peroxidase (ECL system, Amersham). Each protein expression was compared to  $\beta$ -actin.

### RhoA-GTP measurement

RhoA-GTP was measured in mesenteric artery segments using a commercially available kit (G-LISA $\text{\textcircled{R}}$  RhoA Activation Assay Biochem Kit $^{\text{TM}}$ , BK124, Cytoskeleton Inc.).

### Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Significance of the differences between groups was determined by analysis of variance (2-way ANOVA for concentration-response curves) or a non-parametric Mann-Whitney test. Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant. All statistical analysis was performed using Graphpad Prism $\text{\textcircled{R}}$  software.

## Results

### Effect of maternal hyperglycaemia on body weight, glycaemia and arterial blood pressure in offspring

Hyperglycaemia of mother rats ranged from 15 to 25mmol/l induced normal gestational and delivery conditions as previously described [32]. For rats delivered spontaneously at term (21 days); the number of pups per litter was similar in both CMO and DMO groups (13.3  $\pm$  0.7 and 11.1  $\pm$  0.9 pups, for CMO and DMO respectively) with an equivalent birth weight (10.42  $\pm$  0.20grs for CMO and 10.41  $\pm$  0.40grs for DMO). As shown in Table 1, body weight was lower in 18 month-old DMO than in age-matched CMO (Table 1). Nevertheless, no

**Table 1. Physiological parameters of control mother offspring (CMO) and diabetic mother offspring (DMO).**

	3 months		18 months	
	CMO	DMO	CMO	DMO
Body weight (g)	385.6 ± 20.8	376.3 ± 13.2	797.5 ± 52.7	626.0 ± 18.5*
Glycaemia (mmol/l)	7.7 ± 0.5	6.8 ± 0.4	10.3 ± 1.8	13.9 ± 3.2
MBP (mmHg)	93.5 ± 3.9	99.2 ± 4.0	98.4 ± 7.8	125.3 ± 4.3*

At 3 months of age, n = 16 CMO and 12 DMO for body weight and glycaemia, n = 7 CMO and 7 DMO for mean blood pressure (MBP); at 18 months of age, n = 11 CMO and 11 DMO for body weight and glycaemia, n = 6 CMO and 4 DMO for blood pressure. Values are mean ± SEM.

\* p<0.05 DMO vs. CMO.

doi:10.1371/journal.pone.0146830.t001

difference in glycaemia was found between the 2 groups. Finally, mean arterial blood pressure (MBP) was significantly higher in 18 month-old DMO, compared to aged-matched CMO and 3 month-old DMO (Table 1).

### Isolated mesenteric arteries relaxation in offspring

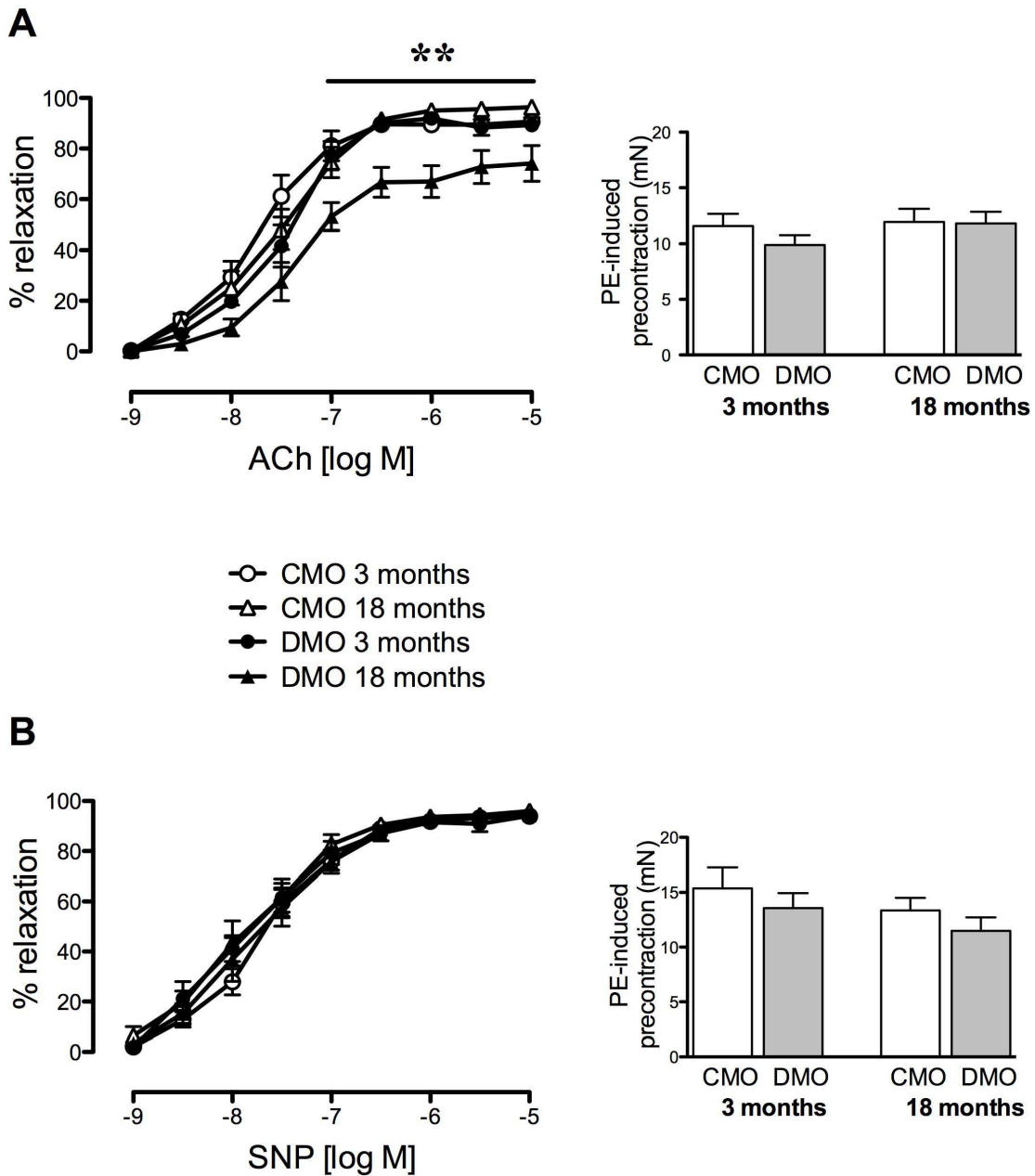
Acetylcholine induced a concentration-dependent relaxation of isolated mesenteric resistance arteries. Achetylcholine-mediated relaxation was significantly lower in mesenteric arteries of 18-month old DMO, compared to age-matched CMO and compared to 3-month old DMO. However, PE-induced pre-contraction was equivalent (Fig 1A). Endothelium-independent (SNP) relaxation was not affected in DMO (Fig 1B).

### Effect of maternal hyperglycaemia on the prostacyclin pathway in offspring

In both 3- and 18-month old DMO, the IP receptor expression level in mesenteric resistance arteries was significantly decreased compared to age-matched CMO (Fig 2A). This was associated with a significant reduction in beraprost-induced relaxation, 3- and 18-month old DMO compared to age-matched CMO (Fig 2B). The level of 6-keto-PGF1α increased with age and was equivalent in DMO and CMO.

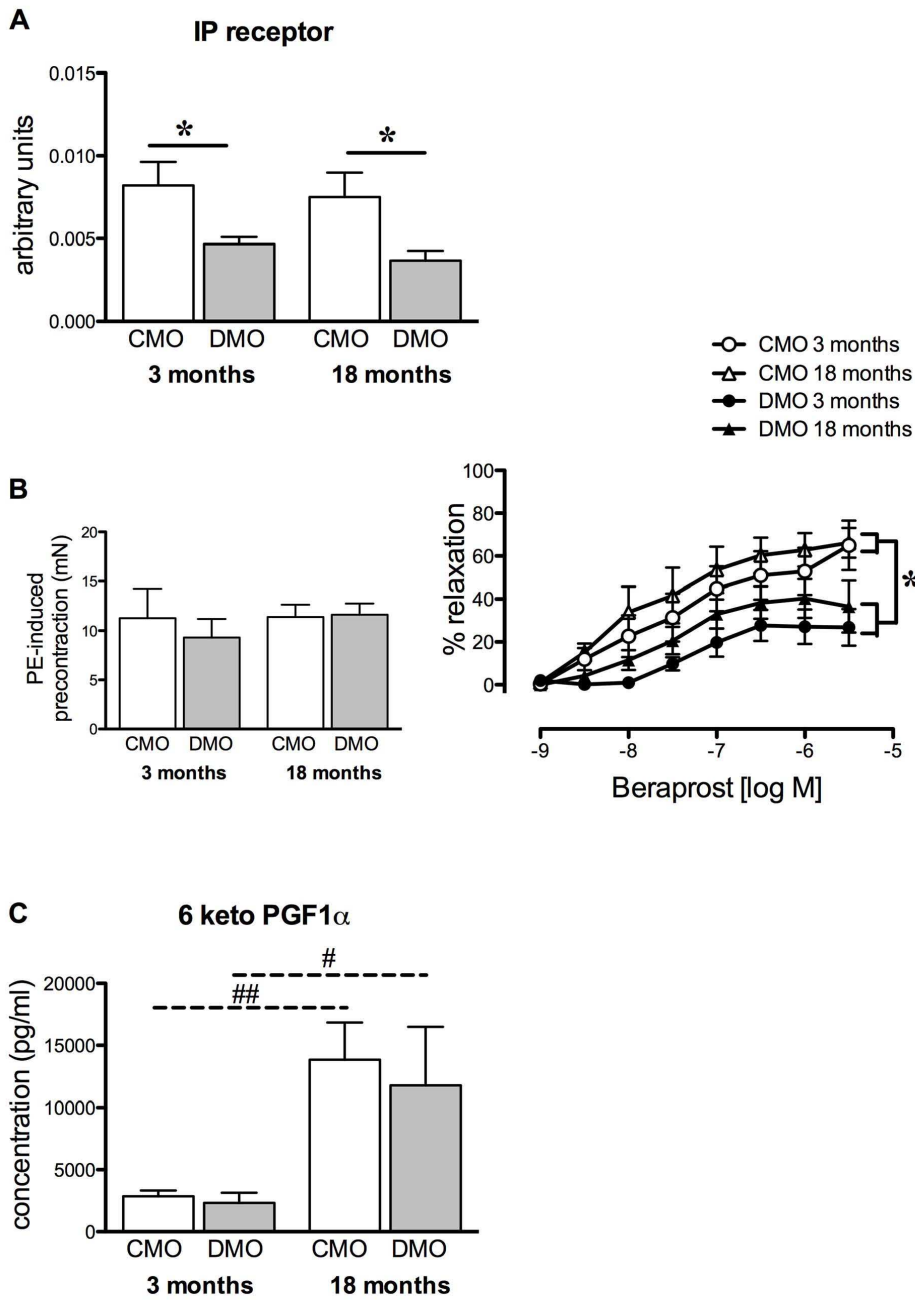
### Vasoconstriction pathways of mesenteric arteries in offsprings

Whereas MLC protein level was similar in CMO and DMO at 3 and 18 months of age (S1 Fig), we observed a significant decrease in pMLC protein expression level in DMO at 3 months, and an increase at 18 months (S1 Fig). Thus in DMO, the pMLC/MLC ratio was slightly decreased at 3 months but 3-fold increased at 18 months of age (Fig 3A). This was associated with an increased pPKA/PKA ratio (Fig 3B and S1 Fig) and activated RhoA protein (Fig 3C and S1 Fig). We analysed MAPK P38 activity and found a similar expression level of P38 in CMO and DMO (S2 Fig), whereas the activity reflected by the ratio of phospho-P38/P38 was significantly increased in DMO at 18 months of age (Fig 3D). Finally, we observed that filamin-1 protein expression, which is implicated in actin reticulation, was similar between CMO and DMO both at 3 and 18 months (Fig 3E), whereas profilin-1, which supports actin polymerisation, significantly increased in 18-month-old DMO (Fig 3F).



**Fig 1. Vascular relaxation of mesenteric arteries in control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring.** Concentration-response curve to acetylcholine (ACh, A) and sodium nitroprusside (SNP, B). Bar graphs represent the level of pre-contraction induced by  $10^{-6}$ M phenylephrine. Values are mean  $\pm$  SEM (n = 7 minimum per group). \* p<0.05 and \*\* p<0.01 DMO vs. CMO.

doi:10.1371/journal.pone.0146830.g001





**Fig 2. Prostacyclin-mediated relaxation and receptor expression level in control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring.** (A) Relative protein expression of the prostacyclin receptor (IP receptor) was analysed by Western-blot in mesenteric arteries of CMO (open bars,  $n = 5$ ) and DMO (solid bars,  $n = 5$ ); each value was normalised to  $\beta$ -actin protein expression. (B) Left panel represents phenylephrine (PE)-induced pre-contraction level; right panel shows concentration-relaxation response curve to beraprost of mesenteric arteries in CMO and DMO ( $n = 5$  at 3 months and  $n = 7$  at 18 months of age for each group). Values are mean  $\pm$  SEM. (C) Measurement of serum 6-keto-PGF1- $\alpha$  (prostacyclin metabolite) in CMO ( $n = 6$ ) and DMO ( $n = 6$ ). Each bar graph represents mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  DMO vs. CMO and ##  $p < 0.01$  18 vs. 3 months-old animals.

doi:10.1371/journal.pone.0146830.g002

### Contractility of isolated mesenteric arteries and histomorphology in offsprings

Phenylephrine- and KCl-mediated contraction were similar in 3- and 18-month-old DMO and CMO (Fig 4A and 4B).

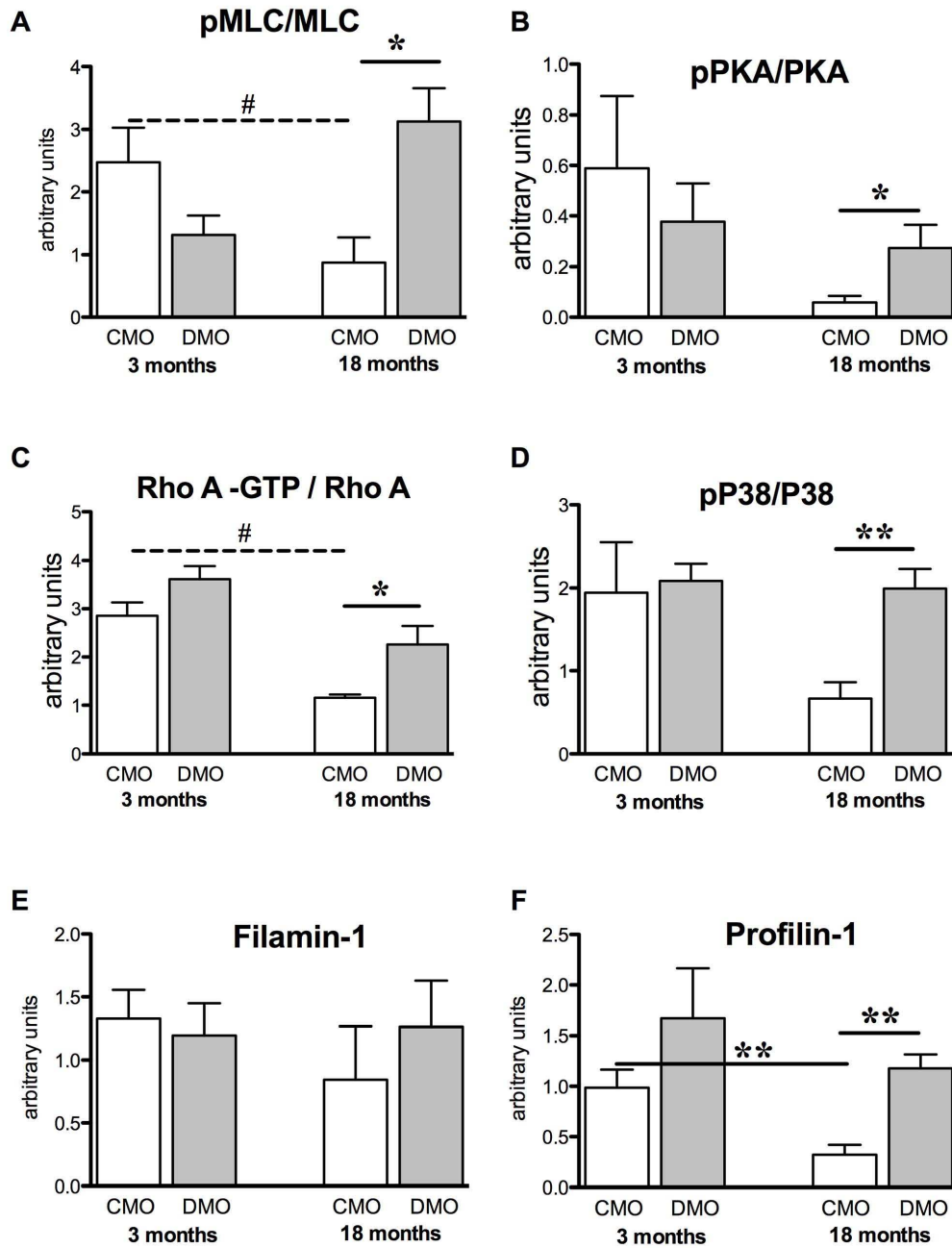
Stepwise increases in pressure induced myogenic tone in third order mesenteric resistance arteries. Passive arterial diameter was not significantly different between groups (Fig 4C). Interestingly, in 18-month old DMO, myogenic tone was maintained at a high level, equivalent to that of 3-month old DMO, although myogenic tone decreased with age in CMO (Fig 4D).

Lumen diameter, media cross sectional area (MCSA) and intima media thickness (IMT) were not significantly different between CMO and DMO and not affected by age (Fig 4E). In addition, the media/lumen ratio was not significantly different in DMO and CMO (Fig 4E).

### Discussion

Resistance arteries play a key role in the control of peripheral vascular resistance, tissue perfusion and, as a result, in cardiovascular homeostasis [33]. As resistance arteries are the main determinant of tissue blood flow and subsequently blood pressure, their vascular reactivity was analysed. Our study evidenced modifications of mesenteric artery vasodilation function in rats exposed to maternal hyperglycaemia at as early as 3 months, before the development of hypertension. Indeed, we found an early decreased IP receptor protein level which had a functional repercussion on vascular relaxation, which worsened thereafter with endothelial dysfunction and an elevated myogenic tone. Although endothelial dysfunction (i.e. alteration in the NO pathway) has been described in numerous experimental models of fetal programming [19,20,34] and detected in our model (decreased PeNOS/eNOS ratio in DMO, data not shown), sustainable changes in the vascular PGI<sub>2</sub>/IP pathway and late perturbation in myogenic tone have never been reported, to the best of our knowledge.

In 3-month old DMO rats, we identified an early alteration in PGI<sub>2</sub>-induced vasodilator response of resistance arteries. We demonstrated that this reduction in PGI<sub>2</sub>-dependent relaxation was associated to a decrease in IP receptor expression level. These results, obtained in resistance arteries, are in agreement with the assumption that modifications affecting the IP receptor could contribute to hypertension in later life [25]. The PGI<sub>2</sub>/IP receptor-mediated vasodilation involves the cAMP pathway and might be implicated in BP regulation [35]. Previous studies have demonstrated that genetic inactivation of PGI<sub>2</sub> synthase causes significant alterations in the architecture of the vascular wall, including thickening of the arterial media and consequently, an increase in arterial BP [36]. Nevertheless, the effector appeared to be the IP receptor instead of the level of PGI<sub>2</sub>. Indeed, decreased IP receptor levels was not associated with changes in PGI<sub>2</sub> generation as evidenced by the absence of modification in serum 6-keto-PGF1 $\alpha$  in DMO compared to CMO. This is in agreement with a previous study showing no change in urine and plasma 6-keto-PGF1 $\alpha$  levels in mice lacking the IP receptor [37]. The high 6-keto-PGF1 $\alpha$  concentration observed in 18 month-old rats could be a consequence of an age-related increase in vascular COX-2 mRNA and protein expressions as previously demonstrated in the rat aorta [38,39]. Although studies involving mice lacking the IP receptor show



**Fig 3. Western blot analysis of contractile proteins.** (A) Activity of MLC reflected by the pMLC/MLC ratio; (B) activity of PKA reflected by the pPKA/PKA ratio; (C) activity of RhoA reflected by the RhoA-GTP/RhoA ratio; (D) activity of MAP kinase P38 reflected by the ratio of pP38/P38 and protein expression levels of (E) filamin-1 and (F) profilin-1, normalised to  $\beta$ -actin were measured in mesenteric arteries from 3- and 18-month old CMO and DMO. Values are mean  $\pm$  SEM (n = 5 minimum per group). \* p<0.05 and \*\* p<0.01 DMO vs. CMO at the same age, ## p<0.05 18 vs. 3 months of age.

doi:10.1371/journal.pone.0146830.g003

contradictory results regarding baseline blood pressure, due to differences in the mice's genetic background [35,37,40], during salt loading, the IP receptor deficiency led to more severe hypertension in comparison to wild-type mice [35,40].

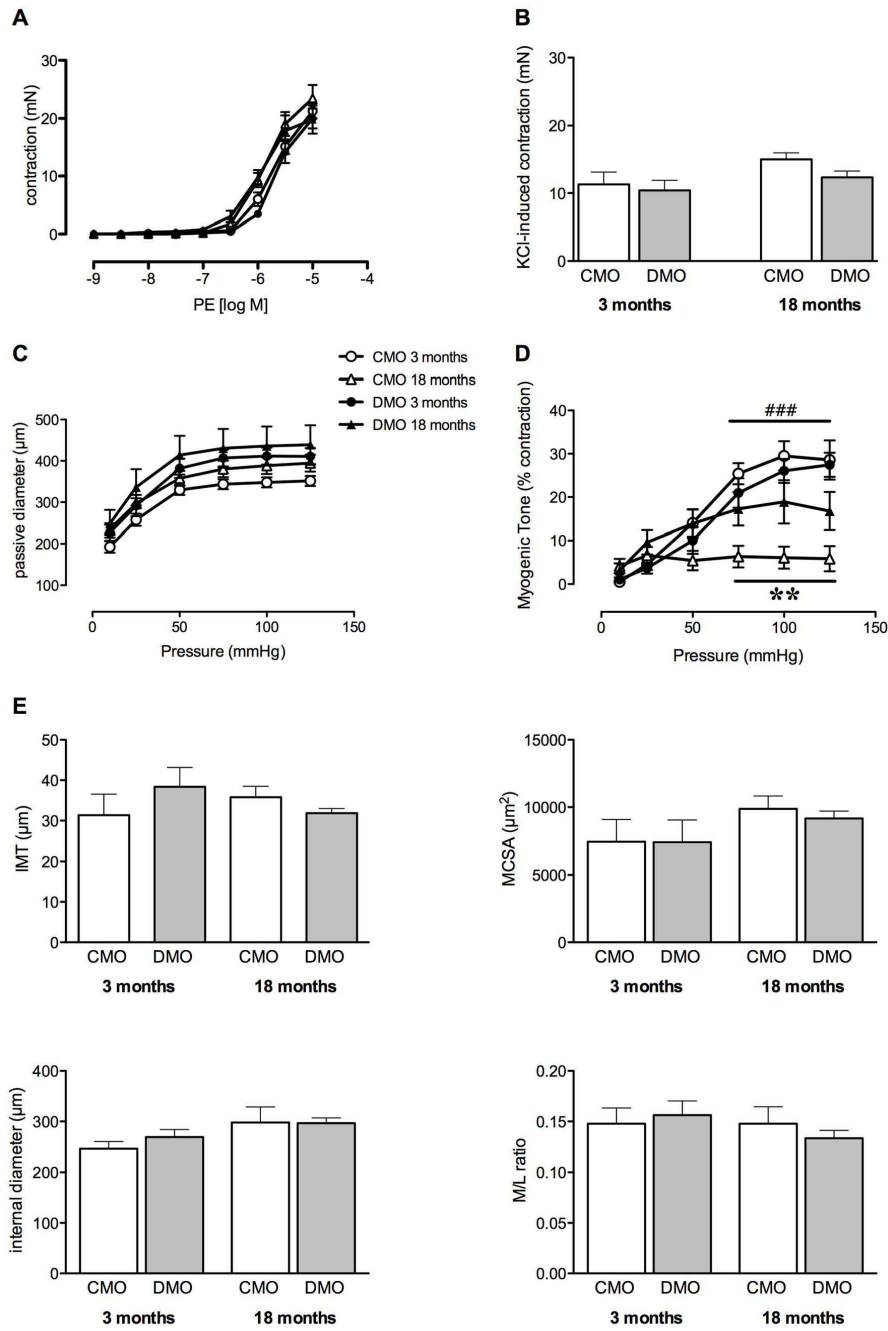
Later in life, DMO developed a deeper endothelial dysfunction besides altered beraprost-induced vasodilation. Indeed, in 18-month-old DMO, endothelium (acetylcholine)-dependent relaxation decreased, even though endothelium-independent (SNP)-induced vasodilation remained unchanged. The diminished endothelium-dependent relaxation in 18 month old DMO could be correlated to a higher myogenic tone of the mesenteric arteries. Thus, this decreased activity associated with the diminished effect of PGI<sub>2</sub>, results in unbalanced vasoconstriction functions followed by increased blood pressure.

In DMO rats, vasoconstriction induced by PE or KCl was not affected, suggesting that the contractile apparatus was preserved. In agreement, restricted or low-protein diets of mothers during pregnancy have shown similar results [41,42], suggesting that fetal programming of cardiovascular disorders could not be due to alteration of the contractile apparatus. Despite these observations, we showed that pressure-induced MT was maintained at a high level in 18-month old DMO compared to age-matched CMO. However, MT has been shown to decrease with age in mice or rats [43,44]. The increased MT may be related to the high blood pressure found in 18 month-old DMO since elevated MT has been reported during the early stages of hypertension development in mouse and rat models [44,45,46]. Pressure or stretch applied to smooth muscle cells induces changes cytoskeletal organization, including actin polymerization and phosphorylation of MLC [11], due to RhoA activation [47]. In 18-month old DMO, we observed higher pMLC/MLC and pPKA/PKA ratios and greater RhoA activity, compared to age-matched CMO and to the 3-month old rats. In addition, we also found an increase in profilin-1 expression levels in 18-month old DMO; this latter finding is in agreement with recent studies showing that profilin-1 is involved in MT [16,48]. However, in contrast to another study showing that filamin-1 is also involved in MT [49], filamin-1 was not affected. Similarly, we observed the maintenance of a high level of pP38/P38 ratio in mesenteric arteries of 18-month old DMO, even though several studies have shown a weak involvement of the P38 MAP kinase pathway in myogenic tone [47,50,51]. Nevertheless, we may hypothesize that some minor pathways such as the P38 MAP kinase pathway might play a more important role in MT in old DMO thus maintaining an elevated level of pressure-induced vasoconstriction. We may also postulate that the high level of MT found in 18-month old DMO results in the maintenance of RhoA expression levels, as RhoA is essential for MT [47]. The high PKA activity observed in arteries of 18-month old DMO could explain this high RhoA level, as PKA activity modulates MT [52], and this could involve a PKA-dependent Ser188 phosphorylation, which protect RhoA from degradation [53].

### Conclusion

Our study shows that exposure to maternal hyperglycaemia involves early vascular perturbations in relation to reprogramming of the PGI<sub>2</sub>/IP pathway. The decreased IP expression is constant over time, although its effect seems to alter vascular response in an age-dependent manner. Second, changes in vascular function are in favour of vasoconstriction, which could take part to the hypertension observed in adult DMO. Thus, the decreased arterial IP







**Fig 4. Vascular contraction and histomorphological parameters of mesenteric arteries from control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring.** (A) Concentration–response curve to phenylephrine (PE); (B) KCl-induced contraction; (C) passive arterial diameter measured in response to increased pressure; (D) myogenic tone and (E) lumen diameter, media cross-sectional area (MCSA), intima-media thickness (IMT) and remodelling index (media/lumen ratio). Values are mean  $\pm$  SEM (n = 5 minimum per group). \*\* p<0.01 DMO vs. CMO at 18 months of age; ### p<0.001 CMO 18 vs. CMO 3.

doi:10.1371/journal.pone.0146830.g004

expression, which does not affect vascular function in 3 month-old rats, could amplify the vascular dysfunction associated.

In humans, a natural mutation of the IP receptor (IP<sup>R212C</sup>) is associated with impaired PGI<sub>2</sub>/IP pathway leading to atherothrombosis and coronary heart disease [54,55]. A more recent study has described a dominant negative action of IP<sup>R212C</sup> on wild-type IP function, which enhances endoplasmic reticulum retention of the IP receptor and reduces signalling in response to a PGI<sub>2</sub> analogue [56].

Thus, perinatal resetting in the PGI<sub>2</sub>/IP pathway seems to be significant and precocious of the development of cardiovascular disease. A better understanding of mechanisms implicated in this resetting of vascular functions by maternal hyperglycaemia would certainly open new epidemiologic and therapeutic perspectives.

### Supporting Information

**S1 Fig. Protein expression levels of (A) MLC, (B) phosphorylated-MLC, (C) PKA, (D) phosphorylated PKA, (E) RhoA normalized to  $\beta$ -actin and (F) RhoA activity in mesenteric arteries from CMO and DMO rats at 3 and 18 month of age.** Open bars represent CMO values and solid bars represent DMO values. Values are mean  $\pm$  SEM (n = 5 minimum per group). (TIF)

**S2 Fig. Protein expression levels of (A) P38 and (B) phosphorylated-P38 (C) normalized to  $\beta$ -actin in mesenteric arteries from CMO and DMO rats at 3 and 18 month of age.** Open bars represent CMO values and solid bars represent DMO values. Values are mean  $\pm$  SEM (n = 5 minimum per group). (TIF)

**S3 Fig. Western blot analysis of mesenteric arteries of CMO and DMO at 3 months of age.** The following proteins were analysed: prostacyclin receptor (IP Rc), beta-actin ( $\beta$  actin), RhoA, profilin-1 (profilin), filamin-1 (filamin), P38 MAP kinase (P38), phosphorylated P38 MAP kinase (pP38), myosin light chain (MLC), phosphorylated myosin light chain (pMLC), protein kinase A (PKA) and phosphorylated protein kinase A (pPKA). (TIF)

**S4 Fig. Western blot analysis of mesenteric arteries of CMO and DMO at 18 months of age.** The following proteins were analysed: prostacyclin receptor (IP Rc), beta-actin ( $\beta$  actin), RhoA, profilin-1 (profilin), filamin-1 (filamin), P38 MAP kinase (P38), phosphorylated P38 MAP kinase (pP38), myosin light chain (MLC), phosphorylated myosin light chain (pMLC), protein kinase A (PKA) and phosphorylated protein kinase A (pPKA). (TIF)

### Acknowledgments

This work was supported by research grants from SFD (Francophone Society of Diabetes), the "Fondation de France" (n°2008002726) and "Région des Pays de La Loire ART N°2011–12354".

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CF MLP LL DH. Performed the experiments: EV AD JB EL. Analyzed the data: CF LL DH. Contributed reagents/materials/analysis tools: MLP. Wrote the paper: CF LL DH MLP MAC.

## References

1. Barker DJ, Bagby SP, Developmental antecedents of cardiovascular disease: a historical perspective. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 2537–2544. PMID: [16049070](#)
2. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL, Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med.* 2008; 359: 61–73. doi: [10.1056/NEJMra0708473](#) PMID: [18596274](#)
3. Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, de Groot E, Stok WJ, Osmond C, et al., Maternal nutrition during gestation and carotid arterial compliance in the adult offspring: the Dutch famine birth cohort. *J Hypertens.* 2007; 25: 533–540. PMID: [17278968](#)
4. Ingelfinger JR, Prematurity and the legacy of intrauterine stress. *N Engl J Med.* 2007; 356: 2093–2095. PMID: [17507709](#)
5. Tarry-Adkins JL, Ozanne SE, Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94: 1765S–1771S. doi: [10.3945/ajcn.110.000620](#) PMID: [21543536](#)
6. Lamireau D, Nuyt AM, Hou X, Bernier S, Beauchamp M, Gobeil F Jr., et al., Altered vascular function in fetal programming of hypertension. *Stroke.* 2002; 33: 2992–2998. PMID: [12468802](#)
7. Ghulmiyyah LM, Costantine MM, Yin H, Tamayo E, Clark SM, Hankins GD, et al., The role of oxidative stress in the developmental origin of adult hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205: 155.e157–111.
8. Gomes GN, Gil FZ, Prenatally programmed hypertension: role of maternal diabetes. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44: 899–904. PMID: [21876875](#)
9. Jones JE, Jurgens JA, Evans SA, Ennis RC, Villar VA, Jose PA, Mechanisms of fetal programming in hypertension. *Int J Pediatr.* 2012; 2012: 584831. doi: [10.1155/2012/584831](#) PMID: [22319540](#)
10. Rodford JL, Torrens C, Siow RC, Mann GE, Hanson MA, Clough GF, Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease. *J Physiol.* 2008; 586: 4709–4720. doi: [10.1113/jphysiol.2008.156976](#) PMID: [18669533](#)
11. Davis MJ, Hill MA, Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999; 79: 387–423. PMID: [10221985](#)
12. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ, Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2012; 14: 198–205.
13. Chinnathambi V, Balakrishnan M, Ramadoss J, Yallampalli C, Sathishkumar K, Testosterone alters maternal vascular adaptations: role of the endothelial NO system. *Hypertension.* 2013; 61: 647–654. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00486](#) PMID: [23339170](#)
14. Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G, Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J.* 2002; 16: 72–76. PMID: [11772938](#)
15. Wang P, Bitar KN, Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27. *Am J Physiol.* 1998; 275: G1454–1462. PMID: [9843784](#)
16. Retailleau K, Toutain B, Galmiche G, Fassot C, Sharif-Naeini R, Kauffenstein G, et al., Selective involvement of serum response factor in pressure-induced myogenic tone in resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 339–346. doi: [10.1161/ATVBAHA.112.300708](#) PMID: [23264443](#)
17. Hu J, Bjorklund A, Nyman M, Gennser G, Mechanical properties of large arteries in mother and fetus during normal and diabetic pregnancy. *Journal of Maternal-Fetal Investigation.* 1998; 8: 185–193. PMID: [9892753](#)
18. Torrens C, Ethirajan P, Bruce KD, Cagampang FR, Siow RC, Hanson MA, et al., Interaction between maternal and offspring diet to impair vascular function and oxidative balance in high fat fed male mice. *PLoS One.* 2012; 7: e50671. doi: [10.1371/journal.pone.0050671](#) PMID: [23227196](#)
19. Rocha SO, Gomes GN, Forti AL, do Carmo Pinho Franco M, Fortes ZB, de Fatima Cavanal M, et al., Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. *Pediatr Res.* 2005; 58: 1274–1279. PMID: [16306207](#)



20. Franco Mdo C, Arruda RM, Dantas AP, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, et al., Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res.* 2002; 56: 145–153. PMID: [12237175](#)
21. Bonacasa B, Siow RC, Mann GE, Impact of dietary soy isoflavones in pregnancy on fetal programming of endothelial function in offspring. *Microcirculation.* 2011; 18: 270–285. doi: [10.1111/j.1549-8719.2011.00088.x](#) PMID: [21418378](#)
22. Sathishkumar K, Elkins R, Yallampalli U, Balakrishnan M, Yallampalli C, Fetal programming of adult hypertension in female rat offspring exposed to androgens in utero. *Early Hum Dev.* 2011; 87: 407–414. doi: [10.1016/j.earlhumdev.2011.03.001](#) PMID: [21450421](#)
23. Giussani DA, Camm EJ, Niu Y, Richter HG, Blanco CE, Gottschalk R, et al., Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS One.* 2012; 7: e31017. doi: [10.1371/journal.pone.0031017](#) PMID: [22348036](#)
24. Nehiri T, Duong Van Huyen JP, Viltard M, Fassot C, Heudes D, Freund N, et al., Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes.* 2008; 57: 2167–2175. doi: [10.2337/db07-0780](#) PMID: [18443204](#)
25. Duong Van Huyen JP, Vessieres E, Perret C, Troise A, Prince S, Guihot AL, et al., In utero exposure to maternal diabetes impairs vascular expression of prostacyclin receptor in rat offspring. *Diabetes.* 2010; 59: 2597–2602. doi: [10.2337/db10-0311](#) PMID: [20622163](#)
26. Belin de Chantemele EJ, Retailliau K, Pinaud F, Vessieres E, Bocquet A, Guihot AL, et al., Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 2216–2224. doi: [10.1161/ATVBAHA.108.171751](#) PMID: [18818417](#)
27. Loufrani L, Levy BI, Henrion D, Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res.* 2002; 91: 1183–1189. PMID: [12480820](#)
28. Loufrani L, Matrougui K, Gorny D, Duriez M, Blanc I, Levy BI, et al., Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation.* 2001; 103: 864–870. PMID: [11171796](#)
29. Henrion D, Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, et al., Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2909–2914. PMID: [9389758](#)
30. Fassot C, Briet M, Rostagno P, Barbry P, Perret C, Laude D, et al., Accelerated arterial stiffening and gene expression profile of the aorta in patients with coronary artery disease. *J Hypertens.* 2008; 26: 747–757. doi: [10.1097/HJH.0b013e3282f4b3d0](#) PMID: [18327085](#)
31. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–254. PMID: [942051](#)
32. Amri K, Freund N, Vilar J, Merlet-Benichou C, Lelievre-Pegorier M, Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes.* 1999; 48: 2240–2245. PMID: [10535460](#)
33. Mulvany MJ, Aalkjaer C, Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990; 70: 921–961. PMID: [2217559](#)
34. Chinnathambi V, Yallampalli C, Sathishkumar K, Prenatal testosterone induces sex-specific dysfunction in endothelium-dependent relaxation pathways in adult male and female rats. *Biol Reprod.* 2013;
35. Francois H, Athirakul K, Howell D, Dash R, Mao L, Kim HS, et al., Prostacyclin protects against elevated blood pressure and cardiac fibrosis. *Cell Metab.* 2005; 2: 201–207. PMID: [16154102](#)
36. Yokoyama C, Yabuki T, Shimonishi M, Wada M, Hatae T, Ohkawara S, et al., Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation.* 2002; 106: 2397–2403. PMID: [12403673](#)
37. Fujino T, Nakagawa N, Yuhki K, Hara A, Yamada T, Takayama K, et al., Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I2 receptor IP. *J Clin Invest.* 2004; 114: 805–812. PMID: [15372104](#)
38. Kang KB, Rajanayagam MA, van der Zyp A, Majewski H, A role for cyclooxygenase in aging-related changes of beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat aortas. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007; 375: 273–281. PMID: [17404710](#)
39. Tang EH, Vanhoutte PM, Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics.* 2008; 32: 409–418. PMID: [18056786](#)
40. Watanabe H, Katoh T, Eiro M, Iwamoto M, Ushikubi F, Narumiya S, et al., Effects of salt loading on blood pressure in mice lacking the prostanoid receptor gene. *Circ J.* 2005; 69: 124–126. PMID: [15635218](#)

41. Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L, et al., Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res.* 2003; 54: 83–90. PMID: [12646717](#)
42. Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De Clerck F, Poston L, Van Assche FA, Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr.* 1999; 81: 73–79. PMID: [10341679](#)
43. Muller-Delp J, Spier SA, Ramsey MW, Lesniewski LA, Papadopoulos A, Humphrey JD, et al., Effects of aging on vasoconstrictor and mechanical properties of rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H1843–1854. PMID: [11959651](#)
44. Gros R, Van Wert R, You X, Thorin E, Husain M, Effects of age, gender, and blood pressure on myogenic responses of mesenteric arteries from C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H380–388. PMID: [11748085](#)
45. Huang A, Sun D, Koller A, Endothelial dysfunction augments myogenic arteriolar constriction in hypertension. *Hypertension.* 1993; 22: 913–921. PMID: [8244524](#)
46. Hughes JM, Bund SJ, Arterial myogenic properties of the spontaneously hypertensive rat. *Exp Physiol.* 2002; 87: 527–534. PMID: [12481926](#)
47. Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D, Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension.* 2005; 45: 974–979. PMID: [15837833](#)
48. Moustafa-Bayoumi M, Alhaj MA, El-Sayed O, Wisel S, Chotani MA, Abouelnaga ZA, et al., Vascular hypertrophy and hypertension caused by transgenic overexpression of profilin 1. *J Biol Chem.* 2007; 282: 37632–37639. PMID: [17942408](#)
49. Sharif-Naeini R, Folgering JH, Bichet D, Duprat F, Lauritzen I, Arhatte M, et al., Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell.* 2009; 139: 587–596. doi: [10.1016/j.cell.2009.08.045](#) PMID: [19879844](#)
50. Hoefler J, Azam MA, Kroetsch JT, Leong-Poi H, Momen MA, Voigtlaender-Bolz J, et al., Sphingosine-1-phosphate-dependent activation of p38 MAPK maintains elevated peripheral resistance in heart failure through increased myogenic vasoconstriction. *Circ Res.* 2010; 107: 923–933. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.110.226464](#) PMID: [20671234](#)
51. Massett MP, Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G, Koller A, Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H2282–2287. PMID: [12427592](#)
52. Schubert R, Lehmann G, Serebryakov VN, Mewes H, Hopp HH, cAMP-dependent protein kinase is in an active state in rat small arteries possessing a myogenic tone. *Am J Physiol.* 1999; 277: H1145–1155. PMID: [10484437](#)
53. Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, et al., Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005; 96: 1152–1160. PMID: [15890975](#)
54. Arehart E, Stitham J, Asselbergs FW, Douville K, MacKenzie T, Fetalvero KM, et al., Acceleration of cardiovascular disease by a dysfunctional prostacyclin receptor mutation: potential implications for cyclooxygenase-2 inhibition. *Circ Res.* 2008; 102: 986–993. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.107.165936](#) PMID: [18323528](#)
55. Stitham J, Arehart EJ, Gleim S, Douville K, MacKenzie T, Hwa J, Arginine (CGC) codon targeting in the human prostacyclin receptor gene (PTGIR) and G-protein coupled receptors (GPCR). *Gene.* 2007; 396: 180–187. PMID: [17481829](#)
56. Ibrahim S, Tetruashvily M, Frey AJ, Wilson SJ, Stitham J, Hwa J, et al., Dominant negative actions of human prostacyclin receptor variant through dimerization: implications for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 1802–1809. doi: [10.1161/ATVBAHA.110.208900](#) PMID: [20522800](#)

## **Deuxième Partie: Effets de l'exposition *in utero* au diabète maternel sur le remodelage vasculaire chez le mâle**

2<sup>ème</sup> article : "***Maternal diabetes impacts inward arterial remodelling in male rat offspring***"

**Abdallah Dib**, Jennifer Bourreau, Ziad Fajloun, Laurent Loufrani, Daniel Henrion and Céline Fassot

***Article en préparation***

## Contexte scientifique

Toute variation de l'environnement hémodynamique est perçue au niveau des cellules vasculaires et se traduit par des modifications fonctionnelles et structurales des petits et gros vaisseaux. Les cellules qui composent les artères s'adaptent à leur environnement mécanique et sont capables de supporter les contraintes qui leur sont imposées sous forme de pression ou de flux. En réponse à ces contraintes, le vaisseau est capable de se « restructurer » par une modification de son diamètre ou de l'épaisseur de sa paroi (remodelage artériel) dans le but de normaliser les contraintes de la paroi.

Dans un modèle de rat soumis *in utero* au diabète maternel, nous avons mis en évidence des perturbations de la réactivité aussi bien des artères conductance que des artères de résistance chez les DMO dès l'âge de 3 mois (notamment des anomalies de réponse à la PGI<sub>2</sub>), suivies à plus long terme d'un tonus myogénique restant élevé chez les rats âgés. Parce que la PGI<sub>2</sub> joue un rôle clé dans le contrôle du tonus vasculaire en favorisant la vasodilatation (Fetalvero et al., 2006) et que le tonus myogénique assure l'autorégulation du flux sanguin dans les organes et le relie ainsi aux propriétés intrinsèques du muscle lisse (Kauffenstein et al., 2016), les modifications observées sont en faveur d'un tonus vasoconstricteur excessif. Des travaux antérieurs ont mis en évidence une étroite relation entre tonus vasculaire et remodelage artériel. En effet, la vasoconstriction persistante est capable d'induire un remodelage constrictif dans plusieurs types d'artères (Bakker et al., 2002, 2004, 2005). Ce remodelage peut être inhibé ou reversé par des composés vasodilatateurs tels que les inhibiteurs des canaux calciques (Bakker et al., 2002; Eftekhari et al., 2007). Aussi une relation de cause à effet existe entre tonus vasculaire et remodelage, le tonus vasculaire étant un facteur déterminant dans le type de remodelage développé par l'artère. Ces altérations de la fonction vasculaire étant retrouvées dans de nombreux modèles d'exposition *in utero* au diabète maternel (Duong Van Huyen et al., 2010; Holemans et al., 1999; Manderson et al., 2002; Vessières et al., 2016), il était intéressant d'étudier le remodelage des grands et petits vaisseaux chez ces animaux en réponse à la pression ou au flux ainsi que la programmation des mécanismes de remodelage.

## Résultats majeurs

Dans cette seconde étude, alors que les rats issus de mères diabétiques développent une HTA à l'âge adulte, nous n'observons aucun remodelage artériel aussi bien dans les artères de conductance que dans les artères de résistance à un âge post-hypertensif (18 mois). Au niveau de l'aorte, cette absence de remodelage chez les animaux DMO peut être expliquée par l'augmentation des points d'ancrage observés entre la matrice extracellulaire et les cellules musculaires lisses permettant ainsi une baisse de la contrainte pariétale sans modification de l'épaisseur du vaisseau.

De plus, alors qu'une diminution de flux sur les artères mésentériques entraîne un remodelage constrictif chez des animaux contrôles (CMO), nos résultats chez les DMO montrent, après 7 et 21 jours de ligature une absence de remodelage bas-flux. Une étude mécanistique a mis en évidence une anomalie d'activation de la transglutaminase au niveau de ces artères pouvant expliquer l'absence de remodelage.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

**Cette étude met donc en évidence une reprogrammation de la structure des vaisseaux et des mécanismes de remodelage chez les rats issus de mères diabétiques.**

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

## **Maternal diabetes impacts inward remodelling in male rat offspring**

Abdallah DIB<sup>a</sup>, Jennifer BOURREAU<sup>a</sup>, Ziad FAJLOUN<sup>b</sup>, Laurent LOUFRANI<sup>a,c</sup>, Daniel HENRION<sup>a,c,d</sup>, Céline FASSOT<sup>a</sup>

<sup>a</sup> CNRS UMR 6214 INSERM U1083, MITOVASC, University of Angers, Angers, France

<sup>b</sup> Azm Center for Research in Biotechnology and Its Applications, Doctoral School of Science and Technology and Faculty of Sciences III, Lebanese University , Tripoli , Lebanon

<sup>c</sup> University Hospital of Angers, Angers, France

<sup>d</sup> Cardiovascular Functions In Vitro (CARFI) platform, Angers, France

**Running head:** Fetal programming of vascular structure and function

**Supports :** This study was supported by Région Pays de Loire (n°2011-12354) and A.D. is supported by University of Angers.

**Disclosures:** None

### **Corresponding author:**

Dr Céline FASSOT, PhD

UMR CNRS 6214 – INSERM 1083

Faculté de Médecine

Rue haute de Reculée

49045 Angers, France

Phone: +33 2 41 73 58 77

Fax: +33 2 41 73 58 95

E-mail: [celine.fassot@inserm.fr](mailto:celine.fassot@inserm.fr)

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



**Word count:**

**Total number of figures : 4**

**Supplementary digital content files: 2**

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

## Abstract

**Objective:** Intra-uterine environment modifications are now recognized as an important cause of fetal stress, leading to pre-emptive adaptations to an adverse post-natal environment, and adult diseases. It has been demonstrated that diabetic mothers children have an increased risk to develop cardiovascular adulthood diseases.

In response to pathological stimuli, such as hypertension and blood flow, vessels are able to reorganize their structure. Because remodelling is currently associated with the development of cardiovascular diseases, our objective was to study vascular remodelling after *in utero* exposure to maternal diabetes to investigate the effect of intra-uterine environment perturbations on vascular fetal programming. We developed an animal model of rats exposed *in utero* to moderated maternal hyperglycemia (DMO), which developed hypertension at 6 months of age.

**Methods and Results:** We analysed thoracic aorta structure at pre and post-hypertensive stages (3 and 18 months of age). In old DMO aorta, we did not observe any constrictive remodelling. This could be related to the increase of smooth muscle cell attachments to elastic laminae. Moreover, by *in vivo* mesenteric arteries ligation, we studied vascular remodelling in response to low flow (LF) in 3 months-old animals. One or 3 weeks after ligation, LF arteries of DMO rats did not exhibit constrictive remodelling. Furthermore, transglutaminase activity, essential for constrictive remodelling, was significantly lower in DMO mesenteric arteries.

**Conclusions:** Our results demonstrate that *in utero* exposure to maternal diabetes induces deep changes in vascular remodelling during adulthood. This absence of vascular remodelling could be a pre-emptive adaptation to fetal-programmed hypertension.

**Key words:** maternal diabetes, fetal programming, hypertension, vascular remodelling

## Introduction

Classical risk factors for cardiovascular disease include smoking, obesity, sedentary lifestyle and high blood pressure (Forouhi and Sattar, 2006). However, compelling evidence suggests that intra-uterine and early postnatal environments could play a role in the susceptibility to a number of chronic pathology in later life. In fact, several studies have shown that adult hypertension, diabetes and obesity might have their origin in fetal life (Barker, 1997; Lahti et al., 2010; Lehnen et al., 2013; Simeoni and Barker, 2009; Van Assche et al., 2001). This concept, known as the developmental origins of health and disease, proposes that adverse intra-uterine environment could cause permanent readjustments in fetal homeostatic system leading to lifelong changes in structure and function of the organs (Kajantie et al., 2005; Lehnen et al., 2013; Simmons, 2006).

Nowadays, the global prevalence of diabetes in pregnancy continues to rise. Consequently, the relationship between *in utero* exposure to maternal diabetes and the incidence of cardiovascular diseases, especially hypertension, has been the subject of numerous clinical and experimental studies. It has been demonstrated that children and offspring of diabetic mothers have higher systolic blood pressure (Aceti et al., 2012; Bunt et al., 2005; Gomes and Gil, 2011; Nehiri et al., 2008; Rocha et al., 2005; Wichi et al., 2005). Mechanisms of this early-programmed high blood pressure are complex. Some studies have suggested that maternal hyperglycemia can promote remarkable changes in kidney morphology and function in mature offspring leading to hypertension (Abi Khalil et al., 2010; Gomes and Gil, 2011; Hokke et al., 2013; Nehiri et al., 2008; Nelson et al., 1998). In addition, baroreflex dysfunction and increased activity of the renin angiotensin system have also been reported in adult offspring of diabetic mothers (Chen et al., 2010; Wichi et al., 2005). But increasing evidences propose that functional changes in the vasculature could be one of the major reasons for the increase of blood pressure in offspring of diabetic rats (Duong Van Huyen et al., 2010; Manderson et al., 2002; Porto et al., 2010; Vessières et al., 2016). Indeed, it has been demonstrated that adult offspring of-diabetic rats (DMO) showed several

signs of vascular dysfunction, reflected by a reduced response to endothelium-dependent vasodilators (ACh) in large or small arteries in young and old DMO (Holemans et al., 1999; Rocha et al., 2005; Vessières et al., 2016) due to L-arginine–nitric oxide pathway alteration (Cavanal et al., 2007) or a reduced K<sup>+</sup>(ATP) activity in the cholinergic relaxation (Porto et al., 2010) . In addition, an increased contractile response to noradrenaline was described in DMO involving up-regulation of the COX-2 pathway (Ramos-Alves et al., 2012). Consequently, the balance between vasodilation and vasoconstriction seems to be disturbed. Duong et al have demonstrated a specific gene expression profile of the thoracic aorta in favor of vasoconstriction with altered prostacyclin-induced vasodilation, linked to a reduction of prostacyclin receptor expression (Duong Van Huyen et al., 2010). Moreover, functional studies have shown that pressure-induced vascular tone was exacerbated in old DMO rats while endothelium-mediated dilations induced by acetylcholine or prostacyclin analogues were reduced (Vessières et al., 2016).

Because prostacyclin plays a key role in several vascular functions, in particular in the control of vascular tone by promoting vasodilatation and differentiation of vascular smooth muscle cell (Fetalvero et al., 2006), fetal programming of vascular tone could impact not only the regulation of arterial pressure but also arterial remodelling. Indeed, persistent vasoconstriction induces inward remodelling in several types of arteries (Bakker et al., 2002, 2004, 2005). Inward remodelling could be inhibited or reversed by vasodilator compounds such as calcium channel inhibitors (Bakker et al., 2002) or amlodipine (Eftekhari et al., 2007), demonstrating a close relationship between vascular tone and remodelling (Bakker et al., 2008a).

Chronic diminution in blood flow occur in pathological conditions (arterial occlusive diseases, diabetes and hypertension) (De Mey et al., 2005; Mulvany, 2002). Flow-induced remodelling enables the vascular wall to adjust to new hemodynamic conditions, as described in large (Lehoux et al., 2002) and small (resistance) arteries (De Mey et al., 2005; Mulvany, 2002), and restore flow, shear stress, and wall tension at physiological levels. Under pathological conditions, such as high pressure or decreased flow, the ability of the

vessel to maintain all these parameters constant may be compromised. Thus, maladaptive vascular remodelling is currently recognized as an important contributor to the development of cardiovascular pathologies (Pasterkamp et al., 2000). The relation between prenatal programming and vascular remodelling has not yet been established. Thus, our objective was to study the effect of *in utero* exposure to maternal diabetes on vascular remodelling induced either by chronic changes in blood pressure or blood flow.

## Research Design and Methods

**Animals:** Pregnant Sprague–Dawley rats, weighing 250-300g, were made diabetic on day 0 of gestation by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma, 35mg/kg), as previously described (Duong Van Huyen et al., 2010). The diabetic state was checked in fasted rats by measuring the plasma glucose concentration (AccuChek®, Roche) in their tail blood. Only pregnant females whose plasma glucose ranged between 15 and 25mmol/l were included in the study. This diabetic status was confirmed every two days until delivery. On the day of delivery, the newborn rats were weighed. Each litter was then reduced to 10 pups. All animals were kept in a temperature and light controlled room, at 21°C with a 12 hour light cycle. They had access to food (diet n°3430, Serlab) and tap water ad libitum. Control animals were issued from non-diabetic females (CMO). Each group was composed of males from at least 3 different litters. Before sacrifice, glycaemia was quantified in fed animals, on a sample of tail arterial blood. All experiments were conducted in accordance with the institutional guidelines and the recommendations for the care and use of laboratory animals of the French Ministry of Agriculture. The protocol was approved by the Ethic Committee of “Pays de Loire” (permit n° 00960.01).

**Arterial blood pressure measurements:** At 3 and 18 months of age, systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious rats by tail-cuff plethysmography (BP-2000, Viositech). Briefly, this technic uses transmission photoplethysmography, in which variations in the amount of light transmitted through the tail is the basic signal that is analysed to determine the blood pressure and pulse rate. The diastolic and systolic pressure can be determined by monitoring the vessel dilation as the occlusion cuffs inflates. For good quality, reliability and reproducibility of the measurements, rats were trained during few days before measurements. Then, blood pressure records were made during 7 successive days on quiet animals in a silent ambience at constant temperature under a heating apparatus.

**Isolated perfused kidney:** 3 months-old rats were operated under anesthesia (2.5% isoflurane). After laparotomy, the abdominal aorta, renal arteries, the superior mesenteric artery and the inferior vena cava are cleaned of the surrounding connective tissue. The kidney is released and the crossroads of the abdominal aorta with left renal artery is carefully dissected. A catheter (PE50 / PE20, FMD) is inserted in the abdominal aorta to renal artery (Weiss et al., 1959) and is maintained by a ligature on the abdominal aorta. The kidney, perfused continuously at 37°C by Krebs solution (according to (El-Mas et al., 2003)), is removed carefully and placed in a room heated chamber (Boesen and Pollock, 2007), connected to a peristaltic pump to infuse kidney at given rates. The renal perfusion pressure is measured in response to stepwise increase in perfusion flow (4 to 50 ml/min). Pressure measurements are collected using a data acquisition system (Acqknowledge® software, Biopac).

**Model of ligation:** Three-month-old male rats were anaesthetized (Isoflurane, 2.5%) and submitted to surgery in order to modify blood flow in the mesenteric circulation as described previously (Loufrani and Henrion, 2008) Briefly, three consecutive first-order arteries are used. Ligatures (7-0 silk surgical thread) are applied to second-order branches of the first and third arteries (low flow artery, LF). Equivalent arteries located at distance of the ligated arteries are used as control arteries (normal flow, NF). At the time of anesthesia and at the end of surgery, animals were treated with buprenorphine (TEMGESIC, 0.1 mg/kg, s.c.). After 7 or 21 days, the rats were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation. The gut was excised and the mesenteric arteries were gently dissected. From each rat, HF, LF and NF arteries were isolated and divided in several segments used respectively for pressure–diameter relationship measurements, histological study and biochemical analyses.

**Pressure–diameter relationship in isolated mesenteric arteries:** LF and NF arteries are cannulated at both ends and mounted in a video monitored perfusion system as previously described (Retailleau et al., 2013). Briefly, cannulated arterial segments are placed in a 5 ml

organ bath containing a Ca<sup>2+</sup>-free physiological salt solution with EGTA (2mmol/L) and sodium nitroprusside (SNP, 10 µmol/L). Pressure is progressively increased (10 to 125 mm Hg) in order to determine passive arterial diameter. Pressure and diameter measurements are collected using a data acquisition system (Biopac MP100 and Acqknowledge® software, Biopac). At the end, arterial segments were fixed with formaldehyde under a pressure of 75 mmHg in order to perform histological studies.

**Histomorphometry analysis:** Each segment of mesenteric or renal arteries and thoracic aorta were embedded in Tissue-Tek (Sakura) and frozen in isopentane. Sections (7µm) were stained with orcein in order to measure histomorphometric parameters (internal and external media perimeters, medial cross-sectional area, MCSA) after image acquisition (Nikon Eclipse E600 microscope, Sony camera) and analyze using ImageJ software (NIH).

**Muscle cell attachment to elastic lamellae:** Thoracic aorta of 3 months old CMO and DMO were fixed in 0.1 M phosphate buffer containing 2.5 % of glutaraldehyde (LFG) overnight at 4°C. Samples were then post-fixed with 1% osmium tetroxide/1% potassium ferricyanide for 45 min and dehydrated in a graded series of ethanol. Samples were finally embedded into epoxy resin (Epon, LFG) and ultrathin sections (70 nm) were cut, contrasted with 3% uranyl acetate for 15 min and observed with a JEOL 1400 transmission electron microscope (JEOL) at an accelerating voltage of 120 keV. Image acquisition was made at a magnification of X 12 000. Smooth muscle cell to extracellular matrix connections were defined as elastin expansion that spanned obliquely from the elastic laminae to the surface of the vascular smooth muscle cells (VSMCs) as previously described (Bezie et al., 1998). Results were obtained by analysing 50 images per animal.

**Transglutaminase activity:** Mesenteric arteries of 3 months-old CMO and DMO were split into 4 groups and incubated at 37°C during 24 hours in 100 µL buffer containing Leibovitz medium with 10% fetal bovine serum, a mix of antibiotic-antimycotic solution (1%, 15240062, Gibco), Dapi (5 µg/mL, Molecular Probes), and (1) Alexa Fluor594/Cadaverine (10 µmol/L, A-



30678, Invitrogen), or (2) Alexa Fluor594/Cadaverine + SNP ( $10^{-3}$  mol/L), or (3) Alexa Fluor594/Cadaverine + dithiothreitol (DTT, 2 mmol/L, 43816, Sigma), or (4) Alexa Fluor594/Cadaverine + DTT (2 mmol/L) +SNP ( $10^{-3}$  mol/L). Vessels were mounted on Mowiol and imaged on a confocal microscope (Nikon Eclipse TE2000S). TG2 activity was quantified by spatial integration of AlexaFluor594 signal in ImageJ. Data were corrected for vessel size and depicted in arbitrary units.

**Statistical analysis:** Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Significance of the differences between groups was determined by analysis of variance (2-way ANOVA) for concentration-response curves or a non-parametric Mann-Whitney test for histological analysis. Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant. All statistical analysis were performed using GraphPad Prism® software.

## Results

### **Absence of remodelling in thoracic aorta in response to chronic high blood pressure**

Although CMO and DMO rats have a similar blood pressure at 3 months of age, we observed a greater increase of SBP in 18-months old DMO compared to CMO (Fig 1A), demonstrating the development of hypertension in DMO. Histological analysis of thoracic aorta showed that internal perimeter and MCSA were equivalent between CMO and DMO at 3 months of age (Fig 1B and 1C). But, in 18 months-old animals, we measured an equivalent rise of these parameters both in CMO and DMO despite hypertension (Fig 1B and 1C), showing an absence of arterial remodelling in response to elevated blood pressure in DMO rats. In these animals, electronic microscopy analysis highlighted increased numbers of connections between VSMCs and extracellular matrix (Fig 1D).

### **Modification of kidney hemodynamic**

In isolated perfused kidney of 3 months old animals, flow response curve showed a more important pressure response in DMO rats than in CMO (Fig 2A), demonstrating a rise in peripheral resistances. Histological study of renal artery showed a smaller internal diameter in DMO than in CMO rats, associated with a greater MCSA in DMO animals (Fig 2B). The increased ratio media/lumen in DMO rats indicated the presence of an inward remodelling in renal artery of DMO rats (Fig 2B).

### **Absence of inward remodelling in low-flow mesenteric artery**

In basal conditions, mesenteric arteries of 3 months old DMO have a smaller diameter than in CMO rats ( $213.3 \pm 29.9 \mu\text{m}$  vs  $284.0 \pm 43.7 \mu\text{m}$ , DMO and CMO respectively,  $p < 0,01$ ). After 1 week of ligation, although stepwise increase in pressure induced a decrease of passive diameter in LF artery of CMO rats, no change was observed in LF artery of DMO animals (Fig 3A, S1A). Moreover, in CMO rats, histological parameters showed a decreased MCAS in LF compared to NF (Fig 3B); this modification is associated with a decrease of internal and external diameters (Fig S1B). But, in DMO rats, MCSA was similar in NF and LF

arteries (Fig 3B). Interestingly, 3 weeks after ligation, no modification in LF passive diameter and histological parameters were observed in DMO rats (Fig S2), demonstrating an absence of inward remodelling in case of low flow but not a delay in the onset of remodelling.

#### **Absence of Transglutaminase 2 activity**

In order to test if endogenous TG2 could be activated by a cell-permeable reducing agent, mesenteric arteries were incubated with DTT. In 3 months old CMO rats, TG2 activity, as indicated by incorporation of Alexa Fluor-594/Cadaverine, was higher after stimulation by DTT than in non-stimulated vessels. Moreover, TG2 activity was strongly reduced by SNP (NO donor). Interestingly, in DMO mesenteric arteries, we did not detect any TG2 activity after DTT stimulation (Fig 4).

## Discussion

Chronic alterations in the hemodynamic profile is associated with arterial remodelling (Langille, 1996; Lehoux and Tedgui, 1998). In several forms of hypertension, constrictive remodelling is defined as an increase of wall-to-lumen ratio, associated with hypertrophy in large arteries (Heagerty et al., 1993; Intengan and Schiffrin, 2001). In our model of maternal diabetes, although previous studies have shown that offspring developed hypertension around 6 months of age (Nehiri et al., 2008), our results did not show any modification of physiological parameters of the thoracic aorta despite high blood pressure. This could be related to the increased number of connections between VSMCs and elastic laminae, which thereby could normalize wall stress in response to high blood pressure as it has been demonstrated in the spontaneously hypertensive rat (Bezie et al., 1998).

Kidney is one of the main organs controlling blood pressure. Furthermore, fluctuation in renal perfusion results in alterations in renal resistance arteries such that renal blood flow remains constant. However, in this study, we demonstrated an hypertrophy of the renal artery associated with higher pressures in response to an increased flow at a pre-hypertensive stage. These results might show an alteration in renal vascular resistance which could be linked to an impaired nephrogenesis with a 30% reduction of nephron number in DMO rats (Nehiri et al., 2008). Resistance arteries are the main determinant of tissue blood flow and subsequently blood pressure. Interestingly, Vessières et al have shown an absence of inward remodelling in mesenteric arteries while myogenic tone was maintained at a high level in 18-months old DMO compared to age-matched CMO (Vessières et al., 2016). Myogenic tone ensures auto-regulation of blood flow in organs and relies on the intrinsic property of smooth muscle to contract in response to pressure (Kauffenstein et al., 2016).

On the other hand, low blood flow and high blood pressure are both associated with a reduction in lumen diameter (Buus et al., 2001; Mulvany, 1990). The development of inward remodelling requires two conditions: first a chronic vasoconstriction and secondly a matrix reorganization (Bakker et al., 2002; Langille and Dajnowiec, 2005; Huelsz-Prince et al.,

2013). In our model, even if vasoconstriction state is not affected in DMO, we demonstrated an inhibition of the TG2 activity in mesenteric arteries. Indeed, we tested if endogenous TG2 could be activated by a cell-permeable reducing agent. Our results show, in DMO, the inhibition of TG2 activity highlighted by an absence of Alexa Fluor-594/Cadaverine incorporation after DTT stimulation. Several studies have shown that vascular remodelling of small arteries after reduced blood flow, hypertension, and exposure to vasoconstrictors depends of TG2 activity to stabilize arterial wall and normalize shear stress (Bakker et al., 2005, 2006; Eftekhari et al., 2007). Biological functions of TG2 involve  $\alpha$ 1-adrenergic signalling, and activation of RhoA. Major TG2 function is to stabilize matrix proteins through the formation of specific cross-links. Although protein cross-linking is the main feature of TG2, providing mechanical strength to tissues (Lorand and Graham, 2003), how vascular smooth muscle tone induces TG2 activity remains unknown (Huelsz-Prince et al., 2013).

Finally, our results suggest that TG2 plays a functional role in the progression of the arterial remodelling and highlight a fetal programming of vascular structure and function in response to maternal diabetes.

### **Acknowledgment**

We thank Guillaume Mabileau (SCIAM, Service Commun d'Imagerie et Analyses Microscopiques, Institut de Biologie Santé, Angers, France) who has performed electronic microscopy images acquisition.

### **References**

Abi Khalil, C., Travert, F., Fetita, S., Rouzet, F., Porcher, R., Riveline, J.-P., Hadjadj, S., Larger, E., Roussel, R., Vexiau, P., et al. (2010). Fetal exposure to maternal type 1 diabetes is associated with renal dysfunction at adult age. *Diabetes* 59, 2631–2636.

Aceti, A., Santhakumaran, S., Logan, K.M., Philipps, L.H., Prior, E., Gale, C., Hyde, M.J., and Modi, N. (2012). The diabetic pregnancy and offspring blood pressure in childhood: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 55, 3114–3127.

Bakker, E.N.T.P., van der Meulen, E.T., van den Berg, B.M., Everts, V., Spaan, J.A.E., and VanBavel, E. (2002). Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J. Vasc. Res.* 39, 12–20.

Bakker, E.N.T.P., Buus, C.L., VanBavel, E., and Mulvany, M.J. (2004). Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J. Vasc. Res.* 41, 174–182.

Bakker, E.N.T.P., Buus, C.L., Spaan, J.A.E., Perree, J., Ganga, A., Rolf, T.M., Sorop, O., Bramsen, L.H., Mulvany, M.J., and Vanbavel, E. (2005). Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circ. Res.* 96, 119–126.

Bakker, E.N.T.P., Pisteia, A., Spaan, J.A.E., Rolf, T., de Vries, C.J., van Rooijen, N., Candi, E., and VanBavel, E. (2006). Flow-dependent remodeling of small arteries in mice deficient for tissue-type transglutaminase: possible compensation by macrophage-derived factor XIII. *Circ. Res.* 99, 86–92.

Bakker, E.N.T.P., Matlung, H.L., Bonta, P., de Vries, C.J., van Rooijen, N., and Vanbavel, E. (2008). Blood flow-dependent arterial remodelling is facilitated by inflammation but directed by vascular tone. *Cardiovasc. Res.* 78, 341–348.

Barker, D.J. (1997). Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 13, 807–813.

Bezie, Y., Lacolley, P., Laurent, S., and Gabella, G. (1998). Connection of smooth muscle cells to elastic lamellae in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32, 166–169.

Boesen, E.I., and Pollock, D.M. (2007). Acute increases of renal medullary osmolality stimulate endothelin release from the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292, F185–F191.

Bunt, J.C., Tataranni, P.A., and Salbe, A.D. (2005). Intrauterine exposure to diabetes is a determinant of hemoglobin A(1)c and systolic blood pressure in pima Indian children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 3225–3229.

Buus, C.L., Pourageaud, F., Fazzi, G.E., Janssen, G., Mulvany, M.J., and De Mey, J.G. (2001). Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Circ. Res.* 89, 180–186.

Cavanal, M. de F., Gomes, G.N., Forti, A.L., Rocha, S.O., Franco, M. do C.P., Fortes, Z.B., and Gil, F.Z. (2007). The influence of L-arginine on blood pressure, vascular nitric oxide and renal morphometry in the offspring from diabetic mothers. *Pediatr. Res.* 62, 145–150.

Chen, Y.-W., Chenier, I., Tran, S., Scotcher, M., Chang, S.-Y., and Zhang, S.-L. (2010). Maternal diabetes programs hypertension and kidney injury in offspring. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 25, 1319–1329.

De Mey, J.G.R., Schiffers, P.M., Hilgers, R.H.P., and Sanders, M.M.W. (2005). Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1022–H1027.

Duong Van Huyen, J.-P., Vessières, E., Perret, C., Troise, A., Prince, S., Guihot, A.-L., Barbry, P., Henrion, D., Bruneval, P., Laurent, S., et al. (2010). In utero exposure to maternal diabetes impairs vascular expression of prostacyclin receptor in rat offspring. *Diabetes* 59, 2597–2602.

Eftekhari, A., Rahman, A., Schaebel, L.H., Chen, H., Rasmussen, C.V., Aalkjaer, C., Buus, C.L., and Mulvany, M.J. (2007). Chronic cystamine treatment inhibits small artery remodelling in rats. *J. Vasc. Res.* 44, 471–482.

El-Mas, M.M., Afify, E.A., Omar, A.G., Mohy El-Din, M.M., and Sharabi, F.M. (2003). Testosterone depletion contributes to cyclosporine-induced chronic impairment of acetylcholine renovascular relaxations. *Eur. J. Pharmacol.* 468, 217–224.

Fetalvero, K.M., Shyu, M., Nomikos, A.P., Chiu, Y.-F., Wagner, R.J., Powell, R.J., Hwa, J., and Martin, K.A. (2006). The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1337–H1346.

Forouhi, N.G., and Sattar, N. (2006). CVD risk factors and ethnicity—a homogeneous relationship? *Atheroscler. Suppl.* 7, 11–19.

Gomes, G.N., and Gil, F.Z. (2011). Prenatally programmed hypertension: role of maternal diabetes. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 44, 899–904.

Heagerty, A.M., Aalkjaer, C., Bund, S.J., Korsgaard, N., and Mulvany, M.J. (1993). Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 21, 391–397.

Hokke, S.N., Armitage, J.A., Puelles, V.G., Short, K.M., Jones, L., Smyth, I.M., Bertram, J.F., and Cullen-McEwen, L.A. (2013). Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy. *PLoS One* 8, e58243.

Holemans, K., Gerber, R.T., Meurrens, K., De Clerck, F., Poston, L., and Van Assche, F.A. (1999). Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42, 81–89.

Huelsz-Prince, G., Belkin, A.M., VanBavel, E., and Bakker, E.N.T.P. (2013). Activation of extracellular transglutaminase 2 by mechanical force in the arterial wall. *J. Vasc. Res.* 50, 383–395.

Intengan, H.D., and Schiffrin, E.L. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581–587.

Kajantie, E., Osmond, C., Barker, D.J.P., Forsén, T., Phillips, D.I.W., and Eriksson, J.G. (2005). Size at birth as a predictor of mortality in adulthood: a follow-up of 350 000 person-years. *Int. J. Epidemiol.* 34, 655–663.

Kauffenstein, G., Tamareille, S., Prunier, F., Roy, C., Ayer, A., Toutain, B., Billaud, M., Isakson, B.E., Grimaud, L., Loufrani, L., et al. (2016). Central Role of P2Y6 UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

Lahti, J., Räikkönen, K., Pesonen, A.-K., Heinonen, K., Kajantie, E., Forsén, T., Osmond, C., Barker, D.J.P., and Eriksson, J.G. (2010). Prenatal growth, postnatal growth and trait anxiety in late adulthood - the Helsinki Birth Cohort Study. *Acta Psychiatr. Scand.* 121, 227–235.

Langille, B.L. (1996). Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 834–841.

Langille, B.L., and Dajnowiec, D. (2005). Cross-linking vasomotor tone and vascular remodeling: a novel function for tissue transglutaminase? *Circ. Res.* 96, 9–11.

Lehnen, H., Zechner, U., and Haaf, T. (2013). Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 415–422.

Lehoux, S., and Tedgui, A. (1998). Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension* 32, 338–345.

Lehoux, S., Tronc, F., and Tedgui, A. (2002). Mechanisms of blood flow-induced vascular enlargement. *Biorheology* 39, 319–324.

Lorand, L., and Graham, R.M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140–156.

Loufrani, L., and Henrion, D. (2008). Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Med. Biol. Eng. Comput.* 46, 451–460.

- Manderson, J.G., Mullan, B., Patterson, C.C., Hadden, D.R., Traub, A.I., and McCance, D.R. (2002). Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetologia* 45, 991–996.
- Mulvany, M.J. (1990). Structure and function of small arteries in hypertension. *J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens.* 8, S225–S232.
- Mulvany, M.J. (2002). Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 17, 105–109.
- Nehiri, T., Duong Van Huyen, J.-P., Viltard, M., Fassot, C., Heudes, D., Freund, N., Deschênes, G., Houillier, P., Bruneval, P., and Lelièvre-Pégorier, M. (2008). Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes* 57, 2167–2175.
- Nelson, R.G., Morgenstern, H., and Bennett, P.H. (1998). Intrauterine diabetes exposure and the risk of renal disease in diabetic Pima Indians. *Diabetes* 47, 1489–1493.
- Pasterkamp, G., de Kleijn, D.P., and Borst, C. (2000). Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc. Res.* 45, 843–852.
- Porto, N.P.C., Jucá, D.M., Lahlou, S., Coelho-de-Souza, A.N., Duarte, G.P., and Magalhães, P.J.C. (2010). Effects of K<sup>+</sup> channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 118, 360–363.
- Ramos-Alves, F.E., de Queiroz, D.B., Santos-Rocha, J., Duarte, G.P., and Xavier, F.E. (2012). Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 166, 2198–2208.
- Retailleau, K., Toutain, B., Galmiche, G., Fassot, C., Sharif-Naeini, R., Kauffenstein, G., Mericskay, M., Duprat, F., Grimaud, L., Merot, J., et al. (2013). Selective involvement of serum response factor in pressure-induced myogenic tone in resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 339–346.
- Rocha, S.O., Gomes, G.N., Forti, A.L.L., do Carmo Pinho Franco, M., Fortes, Z.B., de Fátima Cavanal, M., and Gil, F.Z. (2005). Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. *Pediatr. Res.* 58, 1274–1279.
- Simeoni, U., and Barker, D.J. (2009). Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 14, 119–124.
- Simmons, R.A. (2006). Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 917–922.
- Van Assche, F.A., Holemans, K., and Aerts, L. (2001). Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br. Med. Bull.* 60, 173–182.
- Vessières, E., Dib, A., Bourreau, J., Lelièvre, E., Custaud, M.-A., Lelièvre-Pégorier, M., Loufrani, L., Henrion, D., and Fassot, C. (2016). Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed In Utero to Maternal Hyperglycaemia. *PLoS One* 11, e0146830.
- Weiss, C., Passow, H., and Rothstein, A. (1959). Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am. J. Physiol.* 196, 1115–1118.
- Wichi, R.B., Souza, S.B., Casarini, D.E., Morris, M., Barreto-Chaves, M.L., and Irigoyen, M.C. (2005). Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R1129–R1133.



### Legends captions

**Figure 1:** Longitudinal study of thoracic aorta structure at pre-hypertensive (3 months) and hypertensive (18 months) stages in control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring. (A) Evolution of systolic blood pressure (SBP), (B) cross-sectional area of the media (MCSA), (C) internal perimeter of CMO (open bars, n=13 at 3 months of age and n=7 at 18 months of age) and DMO (solid bars, n=13 at 3 months of age and n=5 at 18 months of age). (D) Electronic microscopy images of SMCs attachment showed by red arrows and connexion number (n=3 for CMO, open bars and n=3 for DMO, solid bars) at a pre-hypertensive stage (3 months). Each bar graph represents mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  DMO vs CMO.

**Figure 2:** Kidney hemodynamic study and histological analysis of renal artery in 3 months-old control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring. (A) Flow-response curve in isolated perfused kidney of CMO (white curve, n=5) and DMO (black curve, n=3) rats. (B) Internal, external diameters, cross-sectional area of the media and ratio media/lumen in CMO (open bars, n=4) and DMO (solid bars, n=6). Each bar graph represents mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  DMO vs CMO

**Figure 3:** Flow remodelling analysis of mesenteric arteries in 3 months-old control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring. (A) Low flow (LF) and normal flow (NF) arteries diameters of CMO and DMO in response to stepwise increase pressure (n=7). (B) Cross-sectional area of the media (MCSA) of normal flow (NF) and low flow (LF) arteries in CMO (open bars, n=12) and DMO (solid bars, n=9) rats. Each bar graph represents mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  DMO vs CMO or LF vs NF.

**Figure 4:** Transglutaminase 2 (TG2) activity of mesenteric arteries in 3 months-old control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring. TG2 activity (incorporation of Alexa Fluor-594/Cadaverine) has been measured in non-stimulated artery (basal condition), with SNP

(NO donor, inhibitor of TG2 activity), with DTT (activator of TG2 activity) or with SNP+DTT in CMO (open bars, n=6) and in DMO (solid bars, n=3) rats. Each bar graph represents mean  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.01$  DTT vs non-stimulated.

Fig 1

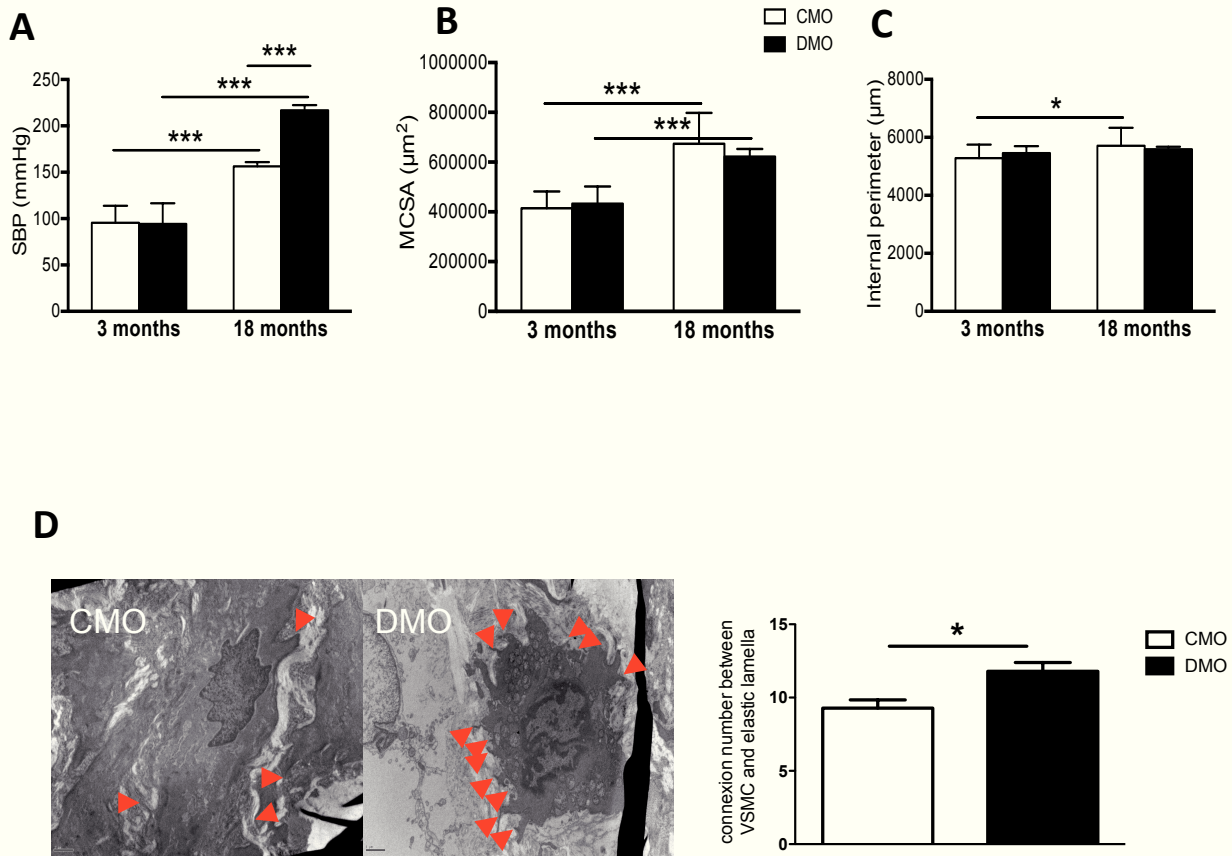
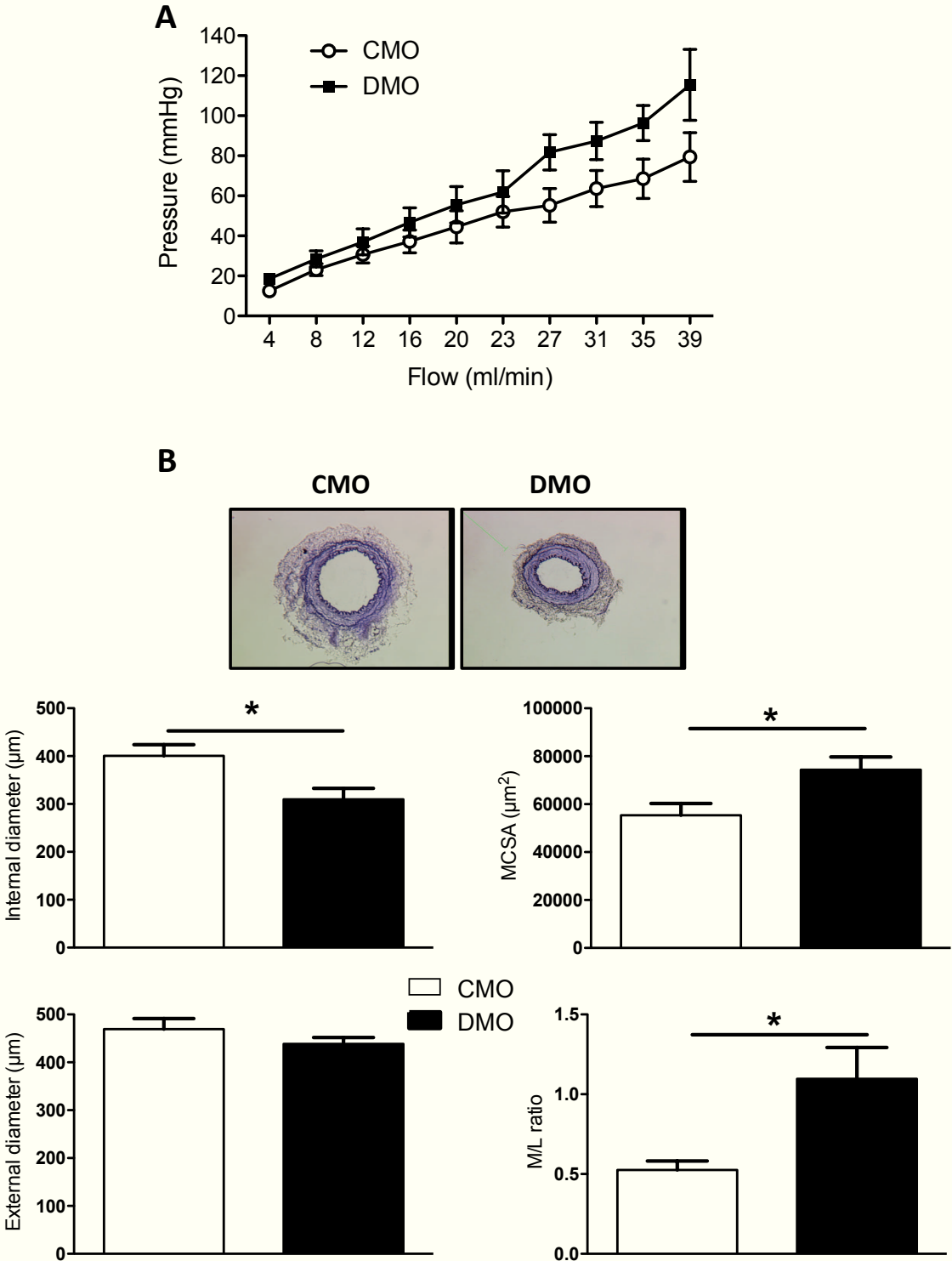
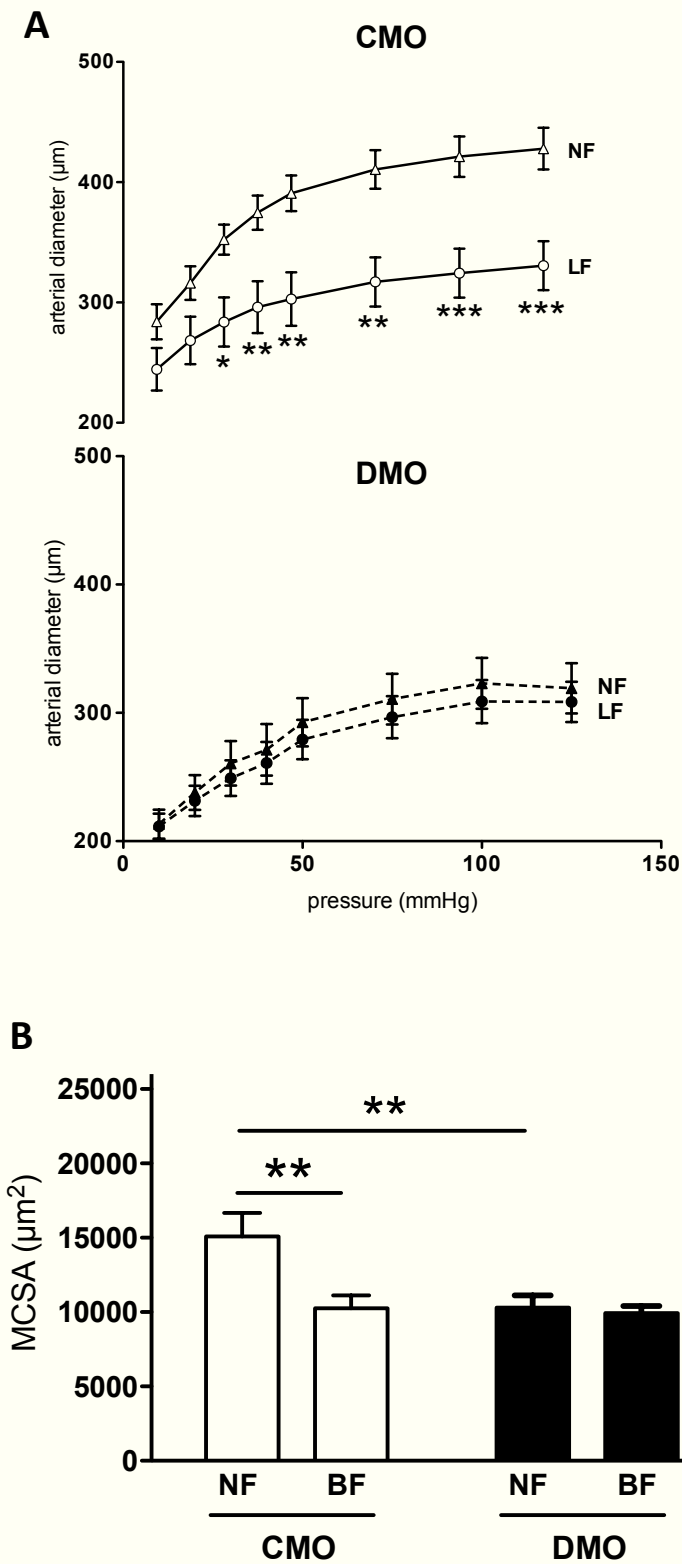


Fig 2



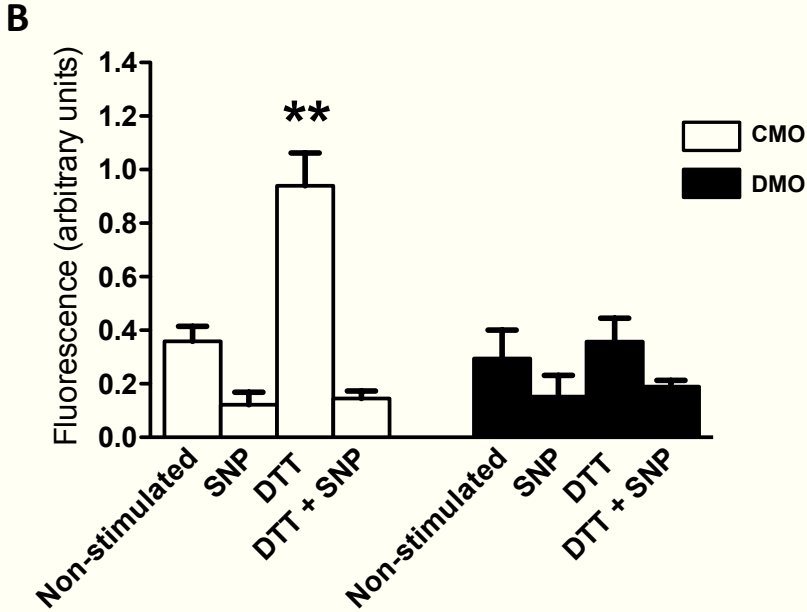
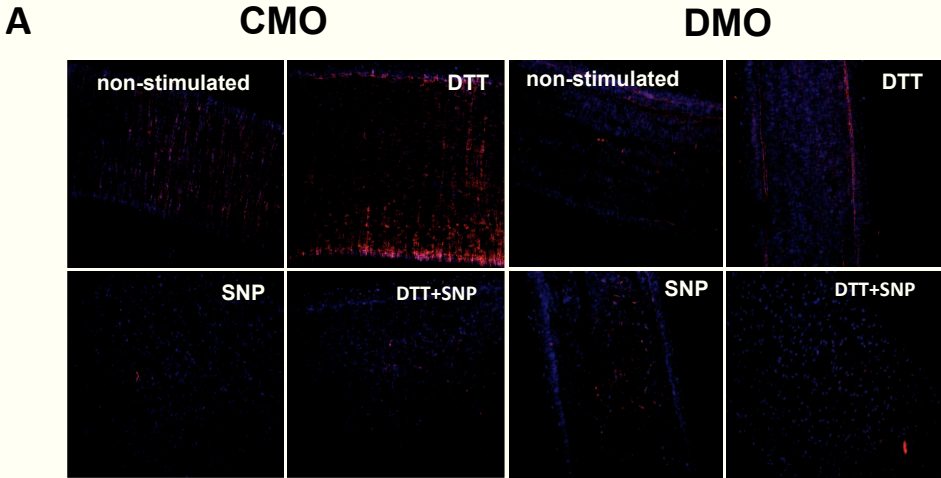
Abdallah Dib | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

Fig 3

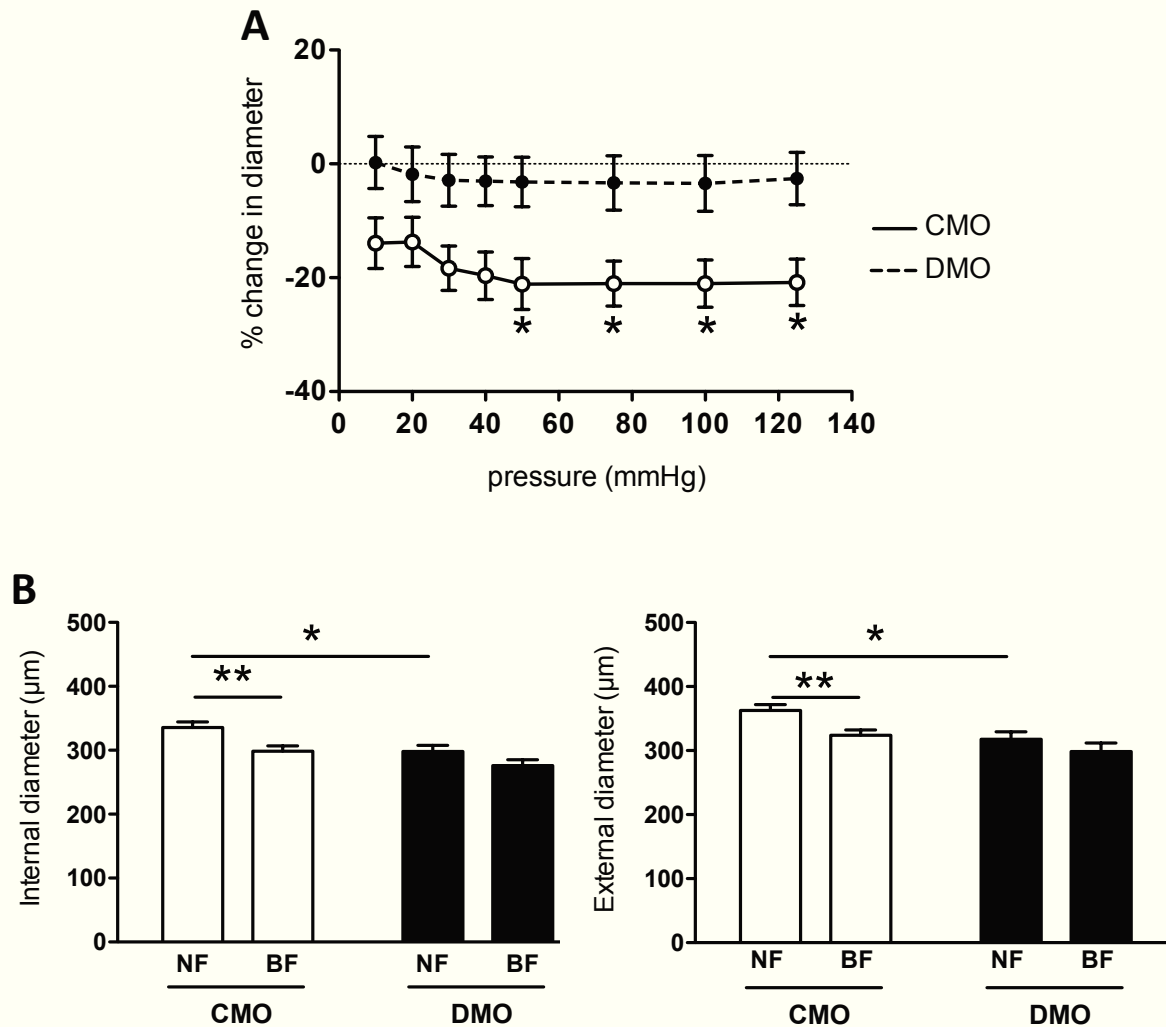


Abdallah Dib | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

Fig 4

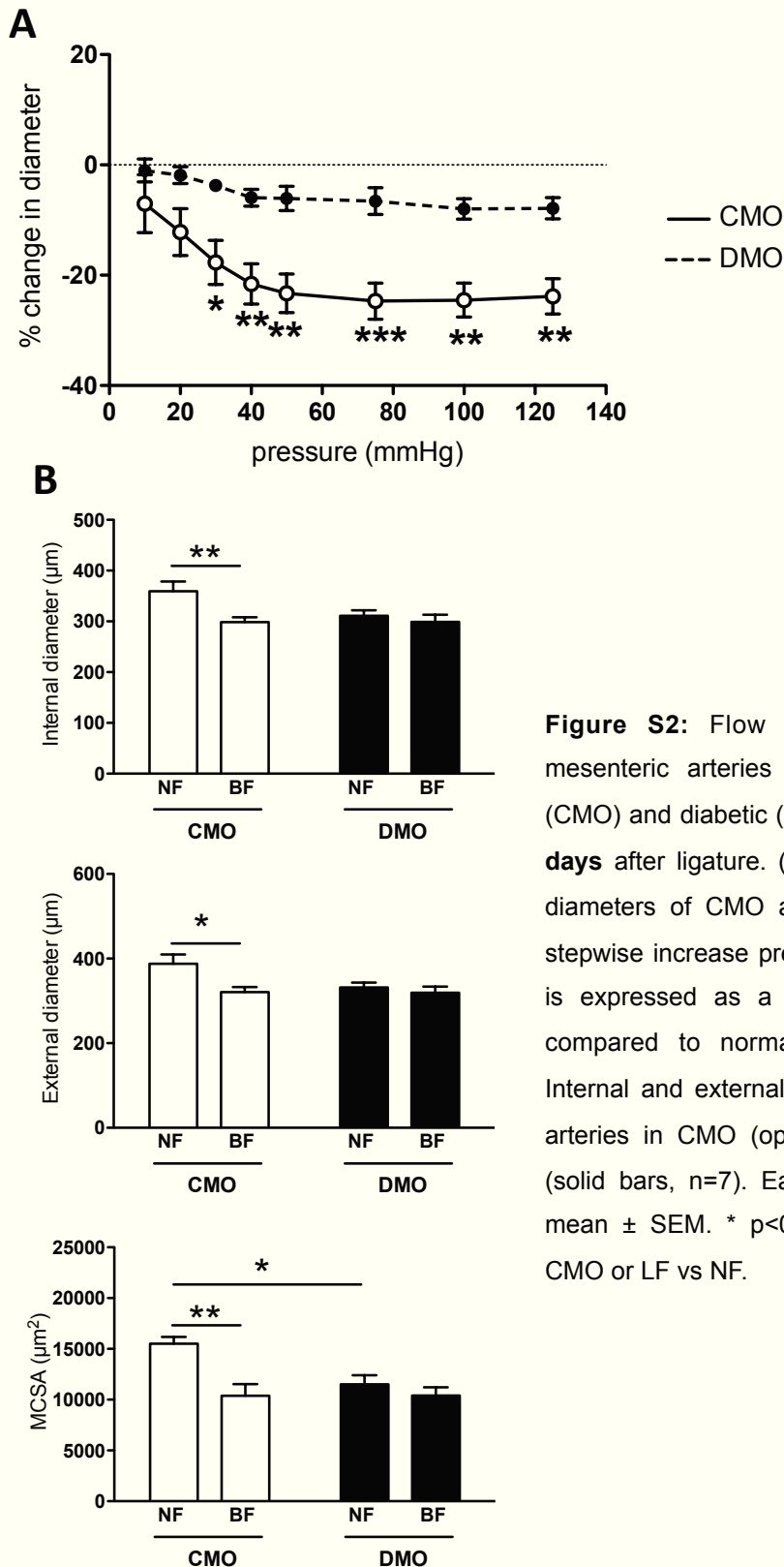


**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



**Figure S1:** Flow remodeling analysis of mesenteric arteries in 3 months-old control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring **7 days** after ligature. (A) Low flow (LF) arteries diameters of CMO and DMO in response to stepwise increase pressure (n=7); LF diameter is expressed as a percentage of change compared to normal flow (NF) artery. (B) Internal and external diameters of NF and LF arteries in CMO (open bars, n=12) and DMO (solid bars, n=9). Each bar graph represents mean  $\pm$  SEM. \* p<0.05, \*\* p<0.01, DMO vs CMO or LF vs NF.

Fig S2



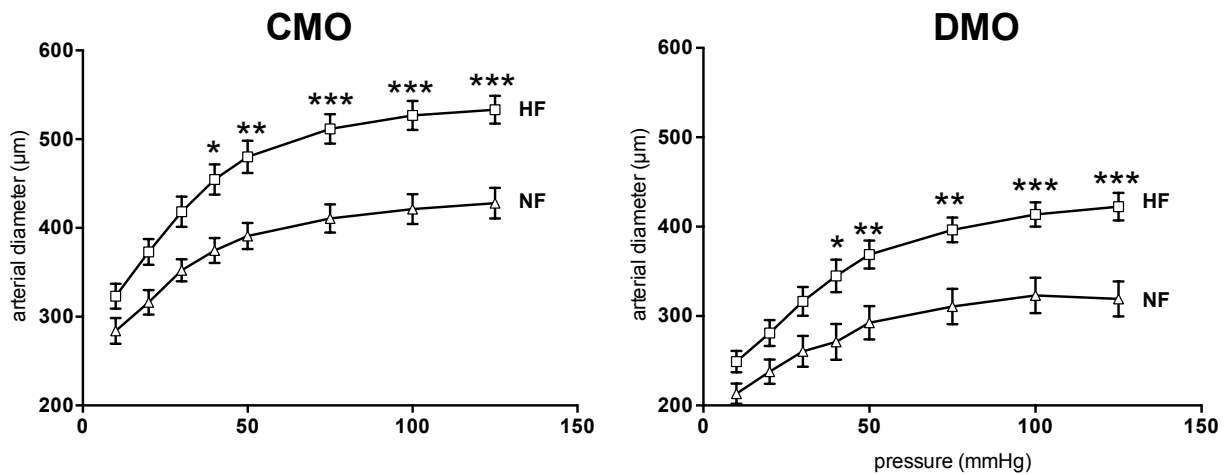
**Figure S2:** Flow remodeling analysis of mesenteric arteries in 3 months-old control (CMO) and diabetic (DMO) mother offspring **21 days** after ligature. (A) Low flow (LF) arteries diameters of CMO and DMO in response to stepwise increase pressure (n=7); LF diameter is expressed as a percentage of change compared to normal flow (NF) artery. (B) Internal and external diameters of NF and LF arteries in CMO (open bars, n=8) and DMO (solid bars, n=7). Each bar graph represents mean  $\pm$  SEM. \* p<0.05, \*\* p<0.01, DMO vs CMO or LF vs NF.



## Données complémentaires

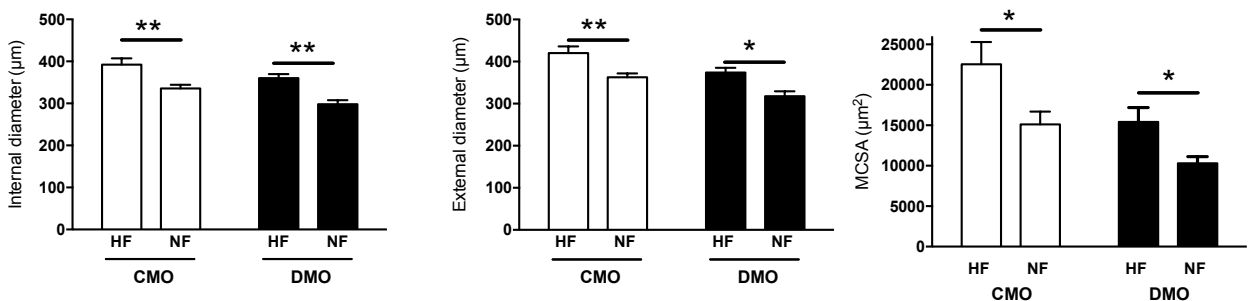
### 1- Remodelage des artères mésentériques en réponse à une augmentation de flux

Dans notre modèle de ligature mésentérique, le vaisseau situé entre les 2 vaisseaux ligaturés voit son flux augmenté (artère HF) afin d'irriguer correctement les tissus en liaison avec l'artères ligaturée. L'analyse du diamètre passif des artères HF montre une augmentation de celui-ci aussi bien chez les rats mâles âgés de 3 mois CMO que DMO (Figure 24), bien que le diamètre de base soit plus petit ( $213,3 \pm 29,9 \mu\text{m}$  et  $284,0 \pm 43,7 \mu\text{m}$ , DMO vs CMO respectivement,  $p < 0,01$ ). Les mêmes observations ont été faites 21 jours après la ligature (résultats non montrés).



**Figure 24:** Diamètre passif des artères mésentériques haut-flux (HF) et normal-flux (NF) 7 jours après ligature de rats mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  sem. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  et \*\*\*,  $p < 0,001$  HF vs NF.

D'un point de vue histomorphométrique, les artères HF des CMO et des DMO ont des diamètres interne et externe plus grands, associés à une augmentation de leur MCSA 7 jours après augmentation du flux (Figure 25). Les mêmes observations ont été faites 21 jours après la ligature (résultats non montrés).



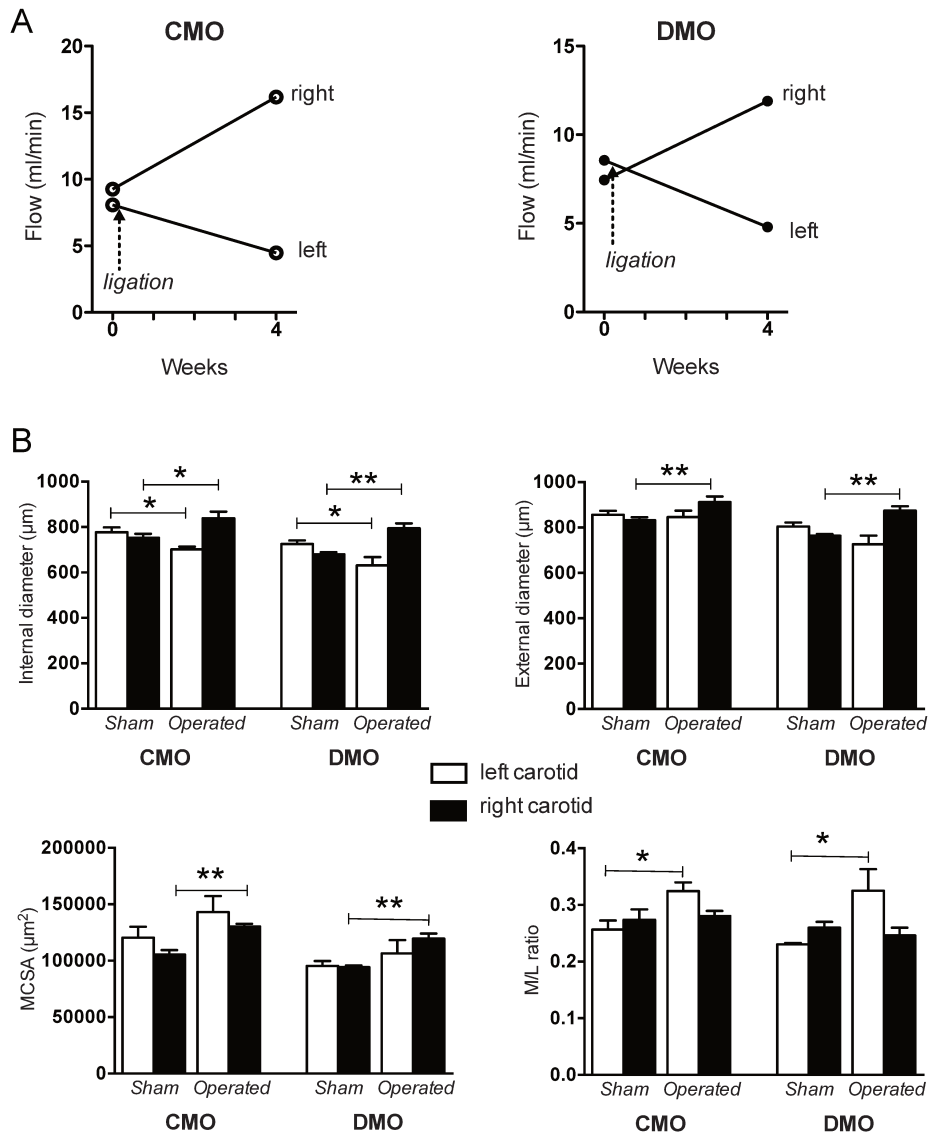
**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

**Figure 25:** Histomorphométrie des artères mésentériques en réponse à une augmentation de flux 7 jours après ligature chez des rats mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO). Diamètres interne et externe, surface cross-sectionnelle de la média (MCSA) des artères haut-flux (HF) et normal-flux (NF). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  sem. \*,  $p < 0,05$  et \*\*,  $p < 0,01$  HF vs NF.

Ces résultats montrent donc l'apparition d'un remodelage expansif suite à l'augmentation de flux chez les DMO.

## 2- Remodelage des carotides en réponse à des variations de flux

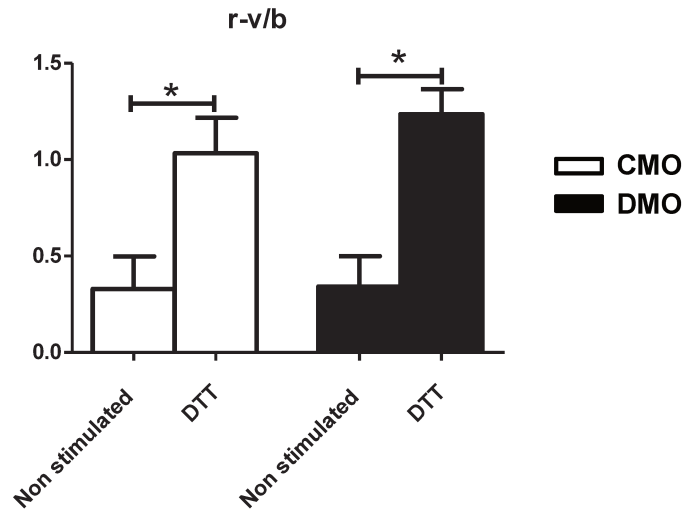
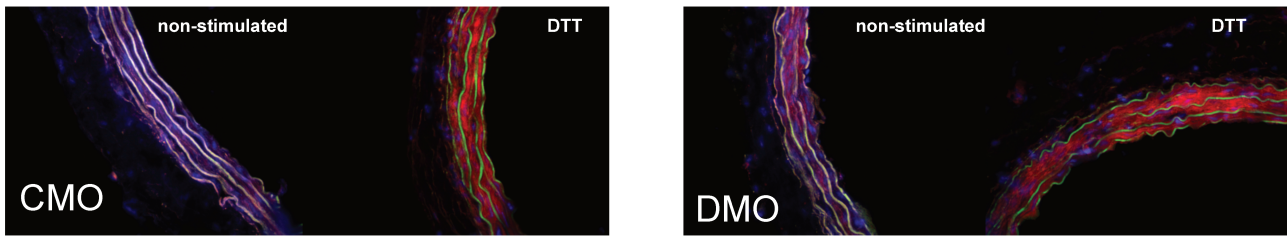
Nous n'observons aucune différence de débit entre la carotide droite et la carotide gauche aussi bien chez les mâles CMO que DMO âgés de 3 mois. Après 4 semaines de ligature de la carotide gauche, le débit de celle-ci est diminué de 53,3% chez les CMO et de 43,9% chez les DMO. Celui de la carotide droite est augmenté de 74,5% chez les CMO et de 74,2% chez les DMO (Figure 26A). L'étude histomorphométrique montre que la diminution de flux sur la carotide gauche est associée à une diminution du diamètre interne et une augmentation de la surface de la média (Figure 26B, histogrammes blancs). Ces modifications aboutissent à un rapport M/L augmenté indiquant la présence d'un remodelage constrictif. L'augmentation de flux observée dans la carotide droite est, quant à elle, associée à une augmentation des diamètres interne et externe et de la MCSA, sans modification du rapport M/L (Figure 26B, histogrammes noirs), indiquant la présence d'un remodelage expansif.



**Figure 26:** Remodelage de la carotide en réponse à des variations de flux après 4 semaines de ligature (Operated) ou sans ligature (Sham) chez des mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO). A : flux carotidien mesuré avant et après ligature par doppler (Système Transonic). B : histomorphométrie des carotides droite et gauche (diamètres interne et externe, surface cross-sectionnelle de la média (MCSA), ratio média sur lumière (M/L)). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  sem. \*,  $p < 0,05$  et \*\*,  $p < 0,01$ .

### 3- Activité de la Transglutaminase 2 au niveau carotidien

Nous n'observons aucune différence d'activité de la Transglutaminase 2 chez les DMO par rapport aux CMO (Figure 27).



**Figure 27:** Activité de la Transglutaminase 2 sur des coupes de carotide de rats mâles âgés de 3 mois issus de mères contrôles (CMO) ou diabétiques (DMO) en présence (DTT) ou en absence (non-stimulated) d'un activateur de l'activité transglutaminase. Les valeurs rouge-vert/bleu (r-v/b) sont exprimées en moyenne  $\pm$  sem. \*,  $p < 0,05$ .

## Troisième Partie: Impact de l'exposition *in utero* au diabète maternel sur la descendance femelle

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

## Contexte scientifique

De nombreuses études épidémiologiques ont examiné l'association entre poids de naissance et pression artérielle mais très peu se sont intéressées aux différences homme-femme (Barker et al., 1993b; Frontini et al., 2004; Huxley et al., 2000). Pourtant, même si de nombreuses études décrivent une relation inverse entre poids de naissance et niveau de pression artérielle aussi bien chez les hommes que chez les femmes (Forsén et al., 2004; Taylor et al., 1997), certaines études montrent que cette relation entre poids de naissance est plus étroite chez les femmes ayant eu un poids de naissance extrêmement bas (Rich-Edwards et al., 1997). Par ailleurs, chez la femme, la maladie coronarienne est associée à un faible poids de naissance en relation avec une anomalie de croissance alors que chez l'homme, la maladie coronarienne est associée à un faible poids de naissance dû à une maigreur à la naissance (faible indice pondéral : poids à la naissance/taille à la naissance). Ainsi, les taux de mortalité les plus élevés par maladie coronarienne ont été observés chez les hommes minces à naissance, mais affichant un rattrapage pondéral important, conduisant à un surpoids à l'âge de 7 ans (Forsén et al., 2004). Concernant l'HTA, des différences entre sexe ont également été décrites (Rosamond et al., 2007). En effet, une augmentation de la pression artérielle est plus fréquente et sévère chez les hommes par rapport aux femmes pré-ménopausées du même âge (Reckelhoff, 2001).

Aussi, ces données suggèrent que la réponse à un environnement foetal défavorable pourrait conduire à un dimorphisme sexuel dans la gravité ou le développement des maladies chroniques de l'adulte.

Les données chez l'homme se limitent à des données épidémiologiques. Celles-ci suggèrent que des conditions défavorables pendant la grossesse ont des effets différents en fonction du sexe. Par exemple, un faible poids de naissance est associé à des altérations cardiaques différentes suivant le sexe, avec une augmentation des résistances vasculaires chez les hommes et une augmentation de l'activité sympathique cardiaque chez les femmes (Jones et al., 2008).

Au niveau expérimental, les comparaisons mâles/femelles ont été étudiées principalement chez le rat (Khan et al., 2003; Langley-Evans et al., 1996; Nivoit et al., 2009; Ozaki et al., 2001; Reverte et al., 2011a) ou la souris (Gallou-Kabani et al., 2010; Vickers, 2011) (Tableau 3). Chez le rat, un retard de croissance intra-utérin est associé à une insuffisance placentaire aboutissant à la naissance de rats mâles ou femelles hypertendus. Néanmoins, après la puberté, seuls les mâles restent hypertendus. A l'inverse, à la puberté, les femelles ont une pression artérielle stabilisée du fait d'un niveau maximum d'œstrogène. Ce rôle protecteur des œstrogènes a été vérifié sur des femelles ovariectomisées qui présentaient alors une forte augmentation de la pression artérielle, effet contrebalancé par l'ajout d'œstrogène ou par le blocage du SRA (Ojeda et al., 2007a). Ces nouveaux résultats montrent que le rôle protecteur des œstrogènes passerait par l'inhibition du SRA. D'autre part, la testostérone semble jouer un rôle dans la stimulation de ce système hormonal, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de pression artérielle chez les descendants mâles (Ojeda et al., 2007a). Il a ainsi été montré que les niveaux de testostérone sont significativement plus élevés chez les descendants mâles avec

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

retard de croissance intra-utérin par rapport aux animaux contrôles (Ojeda et al., 2007b). Alors que la castration de rats mâles témoins n'a pas d'effet significatif sur les niveaux de pression artérielle (Ojeda et al., 2007b, 2010), l'HTA observée chez les descendants mâles avec retard de croissance intra-utérin est abolie après castration ; un traitement par la testostérone rétablit l'hypertension artérielle (Ojeda et al., 2007b, 2010). De plus, il a été démontré qu'un traitement à l'énalapril (inhibiteur de l'enzyme de conversion) diminue la pression artérielle chez les descendants mâles, prouvant que le SRA est bien impliqué dans le développement de l'HTA chez les mâles en cas de perturbation de l'environnement intra-utérin. Ainsi, les niveaux plus élevés de testostérone chez ces animaux pourraient stimuler de façon inappropriée le SRA et entraîner une augmentation de pression artérielle (Ojeda et al., 2010).

Toutes les études mettent en évidence une sensibilité accrue à l'HTA des descendants rats mâles par rapport aux femelles (Alexander, 2003; Dodic et al., 2002; Kwong et al., 2000; Langley-Evans et al., 1996; Maloney et al., 2011; Woods et al., 2005). En effet, les mâles semblent être beaucoup plus sensibles aux anomalies *in utero* que leurs homologues féminins (Grigore et al., 2008) et ce quelque soit les perturbations de l'environnement intra-utérin (dexaméthasone en prénatal, régime pauvre en protéine, déficit de perfusion utérine) (Alexander, 2003; Kwong et al., 2000; Langley-Evans et al., 1996; Ortiz et al., 2003; Woods et al., 2005). L'étude de la fonction endothéliale a montré des perturbations aussi bien chez les descendants mâles que chez les descendants femelles (do Carmo Pinho Franco et al., 2003; Franco et al., 2002; Ozaki et al., 2001). Pourtant, cette susceptibilité à l'HTA pourrait être en lien avec une fonction rénale altérée surtout chez les mâles (Gilbert et al., 2007; Loria et al., 2007; Reverte et al., 2011a; Woods et al., 2005). Il a ainsi été suggéré que cette altération de la fonction rénale, associée à une réduction du nombre de néphrons, était due à des différences anatomiques chez les mâles (Woods et al., 2005). Puis, un rôle important du SRA dans le développement rénal a été suggéré (Woods and Rasch, 1998; Woods et al., 2001, 2005). En effet, de nouvelles études utilisant des antagonistes de l'Ang II ont montré une plus grande sensibilité du développement rénal chez le mâle, même si celui des femelles était également affecté, avec une diminution du taux de filtration glomérulaire et du volume papillaire uniquement chez les mâles (Saez et al., 2007)

Par la suite, le rôle des hormones sexuelles est devenu un thème important de la biologie vasculaire ; ainsi l'accumulation de preuves suggérant que les hormones sexuelles pourraient jouer un rôle protecteur au niveau vasculaire (Perusquía and Stallone, 2010). En effet, de nombreuses études ont démontré un effet bénéfique des hormones sexuelles endogènes sur la régulation du tonus vasculaire, en montrant par exemple, que ces hormones augmentent la libération de NO et / ou sa biodisponibilité, diminuent le stress oxydatif, et réduisent la synthèse de prostanoïdes vasoconstricteurs (Blanco-Rivero et al., 2006; Duckles and Miller, 2010). D'autre part, en agissant sur les facteurs de croissance et les cascades des signaux en lien avec la prolifération des CMVLs, ces hormones sexuelles pourraient avoir un rôle dans le remodelage vasculaire (Bonnet et al., 2009; Ii et al., 2009). Del campo et coll ont d'ailleurs montré que la testostérone et le  $\beta$ -œstradiol empêchaient le remodelage constrictif induit par une vasoconstriction chronique *in vitro*. Ce remodelage, à la fois chez les mâles et les femelles, dépend du NO et de l'activité de la tTG mais chez les femelles, l'inhibition du remodelage

constrictif pourrait être dû à l'inhibition de l'activité tTG médiée par la NO (del Campo et al., 2013). Ces données suggèrent donc des mécanismes d'action différents suivants les hormones sexuelles et donc suivant le sexe (Barrett-Connor and Bush, 1991; Wenger et al., 1993) (Tableau 3).

Référence	résultat principal	Espèce
<b>Modèles expérimentaux</b>		
<b>Chez le mâle</b>		
(Langley-Evans et al., 1996)	Régime pauvre en protéine: pression artérielle élevée chez les descendants mâles par rapport aux femelles	Rat
(Kwong et al., 2000)	Régime pauvre en protéine: augmentation de la pression artérielle chez les descendants mâles	Rat
(Ozaki et al., 2001)	Carence nutritionnelle (réduction de 30%) : augmentation de la pression artérielle et de la dysfonction vasculaire chez les descendants mâles	Rat
(Dodic et al., 2002)	Exposition à la dexaméthasone : pression artérielle plus élevée chez les descendants mâles	Mouton
(Franco et al., 2002)	Restriction nutritionnelle (50%) : réduction de l'expression de la eNOS dans l'aorte chez la descendance mâle	Rat
(Alexander, 2003)	Réduction de la circulation utérine : augmentation importante de la pression artérielle chez les descendants mâles	Rat
(Ortiz et al., 2003)	Injection de dexaméthasone : élévation continue de la pression artérielle chez les descendants mâles	Rat
(Hemmings et al., 2005)	Hypoxie : augmentation myogénique chez les descendants mâles	Rat
(McMullen and Langley-Evans, 2005)	Régime pauvre en protéine : élévation de la pression artérielle dépendant des glucocorticoïdes seulement chez les descendants mâles	Rat
(Woods et al., 2005)	Régime pauvre en protéine : pression artérielle élevée, associée à un nombre de néphrons réduit chez les descendants mâles	Rat
(Zambrano et al., 2005)	Régime pauvre en protéine pendant la lactation : affecte la sensibilité à l'insuline dans la deuxième génération mâle	Rat
(Gilbert et al., 2007)	Restriction nutritionnelle : atteinte de la néphrogenèse chez les descendants mâles	Mouton
(Loria et al., 2007)	Blocage de l'AngII juste après la naissance : augmentation de la protéinurie et altération de la capacité de concentration de l'urine chez les descendants mâles	Rat
(Mueller and Bale, 2007)	Exposition chronique au stress : diminue la capacité d'apprentissage chez les descendants mâles	Souris
(Sinclair et al., 2007)	Réduction péri-conceptionnelle en méthionine et vitamine B : altération de la pression artérielle chez les descendants mâles	Mouton
(Nivoit et al., 2009)	Haute teneur en graisse et en sucre : augmentation de la résistance à l'insuline chez les descendants mâles	Rat
(Tang et al., 2009)	Exposition prénatale à la bétaméthasone : diminution du taux de filtration glomérulaire et de l'excrétion de sodium chez les descendants mâles	Mouton
(Micke et al., 2010)	Faible teneur en protéine au cours du premier trimestre : affecte plus lourdement les mâles dans la vie adulte	Vache
(Reverte et al., 2011b)	Blocage de l'AngII juste après la naissance + régime alimentaire riche en protéine : insuffisance rénale chez les descendants mâles	Rat
(Maloney et al., 2011)	Alimentation maternelle déficiente en méthyl : altération de l'homéostasie du glucose chez les descendants mâles	Rat

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



<b><u>Chez la femelle</u></b>		
(Khan et al., 2003)	Régime riche en graisse : augmentation de la pression artérielle chez la descendance femelle	Rat
(Wilcoxon et al., 2003)	Exposition à l'éthanol : diminution des niveaux placentaires de 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase-2 et hypertrophie ventriculaire gauche chez la descendance femelle	Rat
(Manikkam et al., 2004)	Exposition à la testostérone prénatale : croissance post-natale augmentée chez la descendance femelle	Mouton
(Porter et al., 2007)	Régime riche en sel : augmentation de la réponse au stress chez la descendance femelle	Rat
(Mao et al., 2010)	Haute teneur en matière grasse ou faible teneur en matière grasse des produits de régime : up-régulation des gènes placentaires	Souris
(Gallou-Kabani et al., 2010)	Régime riche en graisse : hypo-méthylation de l'ADN dans le placenta de la descendance femelle	Souris
(Vickers et al., 2011)	Exposition au fructose : diminution du poids du placenta, augmentation de la leptine plasmatique et du glucose chez la descendance femelle	Rat
<b>Épidémiologie</b>		
<b><u>Chez l'homme</u></b>		
(Zarén et al., 2000)	Tabac : diminution du poids de naissance chez les descendants mâles	Humain
(Mingrone et al., 2008)	Obésité : niveaux plus élevés d'insuline en réponse à des tests de tolérance au glucose	Humain
<b><u>Chez la femme</u></b>		
(Roseboom et al., 2001)	Restriction calorique : taux plus élevés d'obésité chez les descendants femmes	Humain
(Clifton, 2005)	Asthme maternel : altération du métabolisme des glucocorticoïdes placentaires et de la croissance	Humain
(Stark et al., 2009)	Administration de bétaméthasone : augmentation de l'activité placentaire 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase-2, positivement corrélée avec le niveau de pression artérielle moyenne	Humain

**Tableau 3:** Etudes expérimentales et cliniques démontrant des différences mâle/femelle sur les effets du développement programmé.

Dans les modèles de programmation fœtale induite par l'exposition *in utero* au diabète maternel, les études s'intéressant aux différences mâles/femelles sont peu nombreuses. Des études chez le rat montrent que, contrairement aux descendants femelles, les descendants mâles issus de mères diabétiques développent de l'HTA autour de 2-3 mois (Holemans et al., 1999; Rocha et al., 2005; Wichi et al., 2005) ou plus tardivement, aux alentours de 6 mois (Katkhuda et al., 2012; Nehiri et al., 2008; Ramos-Alves et al., 2012). Pour expliquer le développement de l'HTA chez ces animaux, les auteurs ont suggéré des changements de sensibilité du baroréflexe, de la réactivité vasculaire, de l'activité du SRA ou des systèmes du métabolisme de l'acide arachidonique (Duong Van Huyen et al., 2010; Gomes and Gil, 2011). En effet, chez les descendants femelles adultes de rats témoins et de rats rendus diabétiques par injection de STZ, alors que la pression artérielle était similaire dans les deux groupes, la fréquence cardiaque était plus faible chez les petits issus de mères diabétiques ; d'autre part, les artères mésentériques de ce groupe avaient une sensibilité accrue à la noradrénaline et des anomalies de relaxation dépendante de l'endothélium (Holemans et al., 1999). Par

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

ailleurs, Segar et coll ont montré une contractilité aortique accrue associée à une dysfonction endothéliale chez les descendants femelles mais pas les mâles (Segar et al., 2009). Ainsi, l'exposition *in utero* à l'hyperglycémie aboutit à des changements cardiovasculaires spécifiques au sexe chez les descendants adulte.

Mais les effets du diabète maternel sur la structure et le remodelage vasculaire chez les descendants femelles en réponse à des variations de flux sont peu connus. L'objectif de cette 3<sup>ème</sup> étude a été d'étudier spécifiquement la structure et les mécanismes de remodelage chez la descendance femelle issue de mères diabétiques.

## Résultats

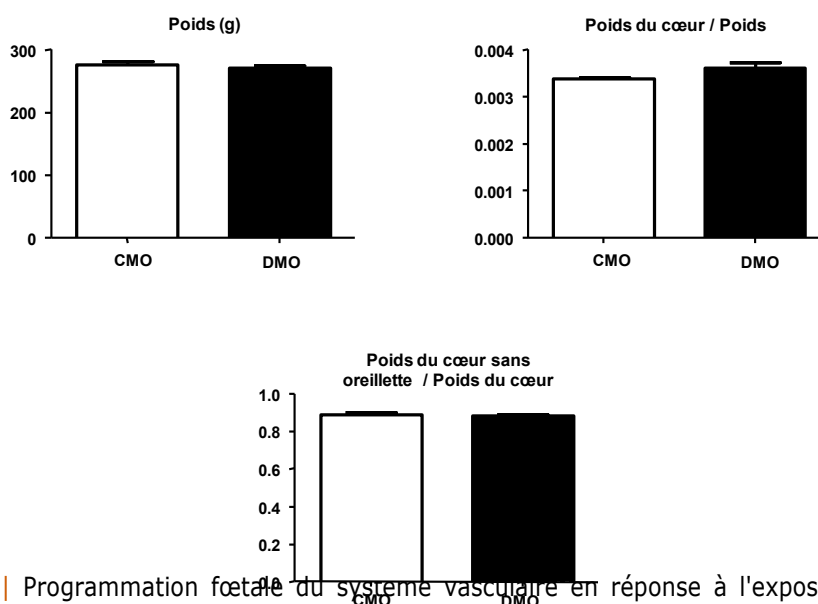
### 1- Données physiologiques

Suite à l'injection de STZ, les mères diabétiques développent une glycémie de (387,1 ± 106,8 mg/dl) par comparaison à celle des mères contrôles (88,8 ± 29,6 mg/dl). Par contre, à l'âge de 3 mois les niveaux de glycémie des animaux issus de mères diabétiques (DMO) et issus de mères contrôles (CMO) sont équivalents (159,2 ± 12,8 vs 172,1 ± 8,2 mg/dl) ainsi que la pression artérielle et la fréquence cardiaque (Tableau 4).

	PAS (mmHg)	PAM (mmHg)	PAD (mmHg)	FC ( bpm)
CMO (n =6)	139,1 ± 1,2	101,8 ± 2,2	81,0 ± 2,9	421,0 ± 10,0
DMO (n=8)	147,0 ± 2,1	107,5 ± 2,2	87,8 ± 2,8	408,6 ± 6,3

**Tableau 4:** Pression artérielle systolique (PAS), moyenne (PAM), diastolique (PAD) et fréquence cardiaque (FC) chez les rates âgés de 3 mois issues de mères contrôles (CMO) et de mères diabétiques (DMO).

Le poids corporel, les ratios poids cœur/poids corporel et poids du cœur sans les oreillettes/poids du cœur sont également équivalents entre CMO et DMO (Figure 28).

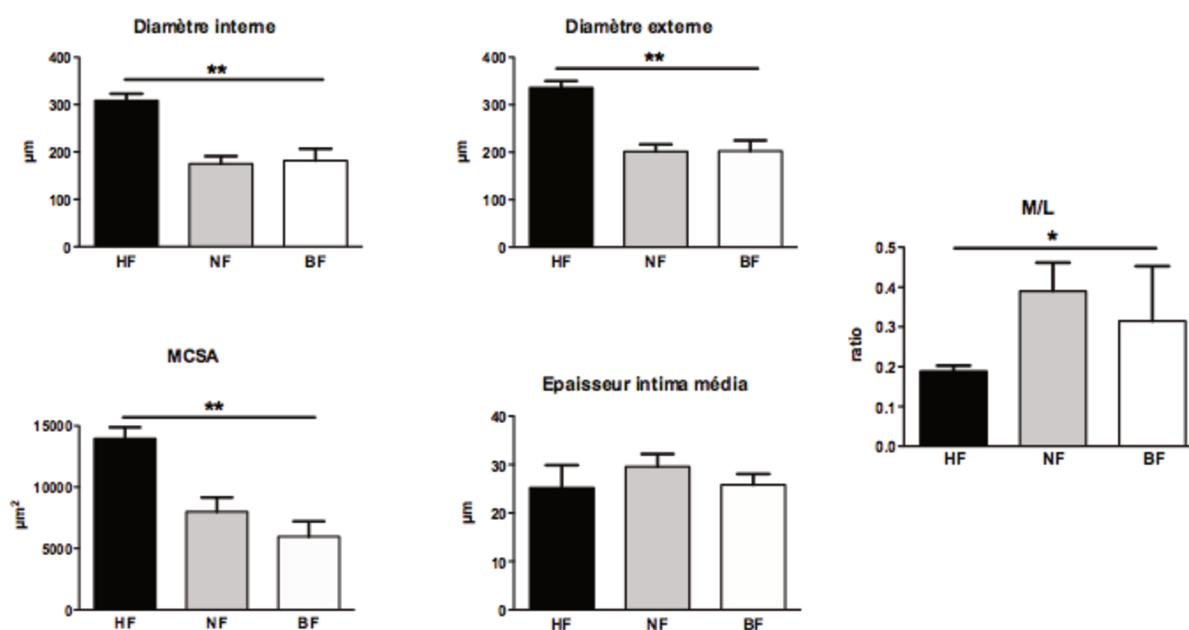


**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

**Figure 28:** Poids corporel, ratios poids du cœur/poids corporel et poids du cœur sans oreillette/poids du cœur des rates âgées de 3 mois issues de mères contrôles (CMO) et de mères diabétiques (DMO).

## 2- Histomorphologie des artères de résistance après 7 jours de ligature

Chez les rats DMO femelles, après 7 jours de ligature, nous observons une augmentation significative des diamètres interne et externe de l'artère haut-flux (HF) par rapport à l'artère normal-flux (NF), associée à une augmentation significative de la MCSA (Figure 29). Par contre, les diamètres interne et externe de l'artère bas-flux (BF) restent équivalents à celui de l'artère NF (Figure 29) démontrant une absence de remodelage constrictif chez ces animaux.



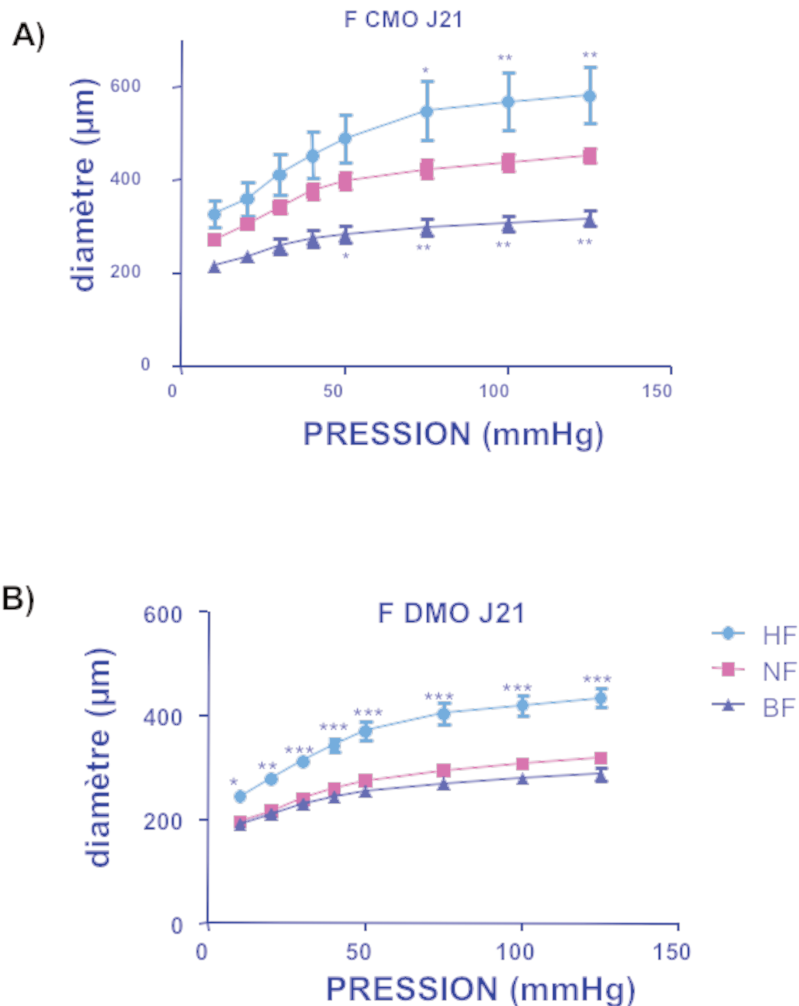
**Figure 29:** Diamètres interne et externe, surface cross-sectionnelle de la média (MCSA) et rapport surface média/surface lumière (M/L) de coupes transversales d'artères mésentériques haut-flux (HF), normal-flux (NF), et bas-flux (BF) de rates âgées de 3 mois issus de mères diabétiques après 7 jours de ligature.

## 3- Diamètres passifs des artères mésentériques après 21 jours de ligature

Le diamètre artériel passif a été mesuré sur des artères mésentériques de rats CMO et DMO après 21 jours de ligature. Les artères à haut,- bas- et normal-flux ont été désignées comme HF, BF et NF, l'artère NF servant de contrôle. L'augmentation progressive de la pression (de 10 à 125 mmHg) induit un accroissement du diamètre interne proportionnellement à la pression appliquée. Chez les CMO, le diamètre interne est plus élevé au niveau de l'artère HF que de l'artère NF, démontrant l'apparition d'un remodelage expansif spécifique à l'augmentation de flux. Inversement, le diamètre interne de l'artère BF est considérablement diminué par

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

rapport à l'artère NF (Figure 30A), ce qui est la caractéristique d'un remodelage constrictif dû à la diminution du flux. Chez les rats DMO, on retrouve bien une augmentation significative du diamètre interne de l'artère HF par rapport à celle de l'artère NF par contre le diamètre interne de l'artère BF reste équivalent à celui de l'artère NF (Figure 30B) quelque soit le niveau de pression appliqué.



**Figure 30:** Variation du diamètre passif d'artères méésentériques haut-flux (HF), normal-flux (NF) et bas-flux (BF) en réponse à une augmentation de pression chez des rats âgés de 3 mois issues de mères contrôles (CMO) et de mères diabétiques (DMO) après 21 jours de ligatures.

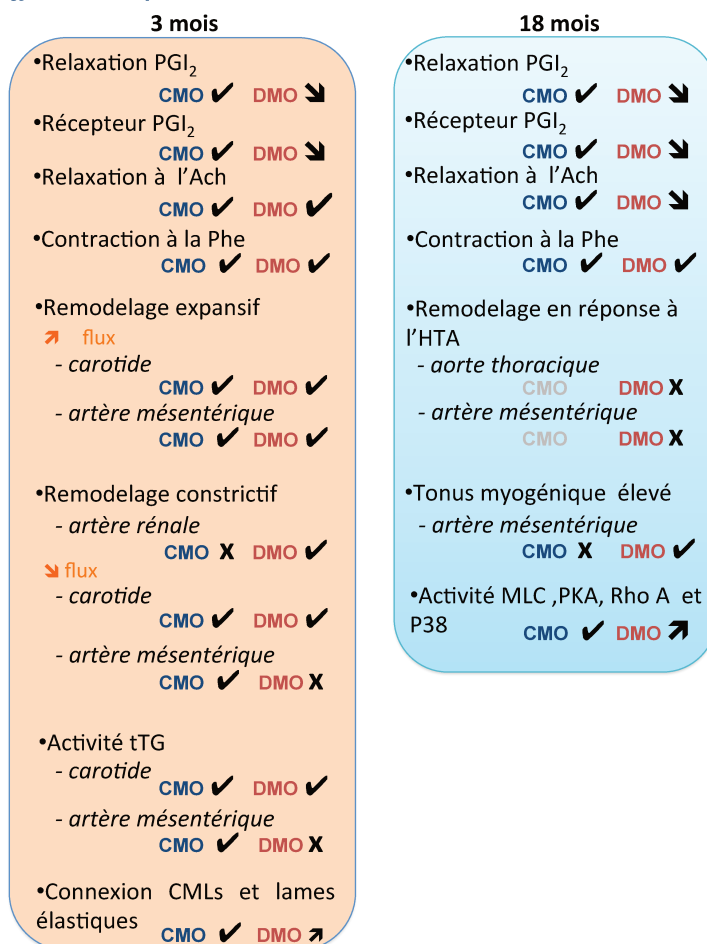
Ces études préliminaires semblent mettre en évidence des anomalies cardiovasculaires chez la descendance femelle adulte identiques à celles observées chez la descendance mâle. En effet, l'évaluation du remodelage vasculaire des artères méésentériques montre la persistance d'un remodelage expansif en réponse à l'augmentation chronique de flux et une absence de remodelage constrictif en cas de diminution du flux aussi

bien 7 jours que 21 jours après ligature. Ces résultats nécessiteront de plus amples investigations notamment dans l'augmentation du nombre d'individus par groupe.

# DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les maladies cardiovasculaires, dont l'HTA, continuent d'être la principale cause de décès dans le monde. Elles coexistent fréquemment avec un diabète de type 2, une dyslipidémie, une résistance à l'insuline et la maladie rénale chronique, reflétant un mécanisme commun qui pourrait être à l'origine lié à l'environnement intra-utérin. En réponse à l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète chez la femme en âge de procréer, le nombre de grossesses sous l'influence du diabète maternel croît régulièrement. Même si il est bien connu que les nourrissons nés de ces mères ont un risque accru de mortalité et de morbidité, les complications à long terme restent moins décrites. La majorité des études s'intéressent à l'apparition d'anomalies métaboliques chez les descendants de mères diabétiques, mais peu d'entre-elles s'intéressent aux altérations cardiovasculaires, y compris au développement de l'HTA. Au cours de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés aux effets du diabète maternel sur la fonction et la structure des vaisseaux de la descendance. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans la figure ci-dessous (Figure 31).

### Effets de l'exposition in utero au diabète maternel chez le mâle



**Figure 31:** Schéma récapitulatif des différents résultats obtenus au cours de cette thèse chez le rat mâle issu de mère contrôlée (CMO) ou de mère diabétique (DMO) à 3 et 18 mois.

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

Dans un modèle expérimental d'exposition *in utero* à une hyperglycémie maternelle modérée, les animaux issus de mères diabétiques (DMO) développent une HTA dès 6 mois ( $165 \pm 5$  mmHg vs  $139 \pm 3$  mmHg,  $p < 0,001$ ), s'aggravant avec l'âge (Nehiri et al., 2008). A un stade pré-hypertensif (3 mois), l'étude de la réactivité des aortes chez ces animaux montre une diminution importante de la vasodilatation induite par un analogue de la  $PGI_2$ , liée à une diminution du nombre de ses récepteurs (récepteur IP) (Duong Van Huyen et al., 2010). La vasodilatation médiée par le couple  $PGI_2$ /IP implique la voie de l'AMPC et pourrait ainsi être impliquée dans la régulation de la pression artérielle (Francois et al., 2005). En effet, en cas d'HTA, il a été montré une modification de l'équilibre entre prostanoïdes vasodilatateurs et vasoconstricteurs (Féléto et al., 2011) renforcé par le fait que les réponses à l'ACh sont restaurées par l'inhibition de la voie des COX-2 (Ramos-Alves et al., 2012). Etant donné que la prostacycline joue un rôle clé dans le contrôle du tonus vasculaire, notamment des artères de résistance, nous avons voulu déterminer si l'hyperglycémie maternelle pendant la grossesse pouvait affecter le tonus vasculaire des artères de résistance à un stade pré-hypertensif (3 mois) et post-hypertensif (18 mois). Concernant les systèmes vasodilatateurs, nos résultats mettent en évidence une relaxation à la  $PGI_2$  réduite dans les artères de résistance aussi bien à 3 mois qu'à 18 mois. La relaxation endothélium-dépendante est également diminuée mais seulement chez les DMO âgés de 18 mois (Figure 31). Ces résultats sont accord avec les travaux menés par Rocha et coll mettant en évidence une diminution de l'effet vasodilatateur à l'ACh chez des DMO dès l'âge de 12 mois (Rocha et al., 2005). En ce qui concerne les systèmes vasoconstricteurs, nous observons le maintien d'un tonus myogénique élevé à l'âge de 18 mois (Figure 31). Ainsi la programmation foetale du tonus vasculaire pourrait influencer sur la régulation de la pression artérielle chez les DMO par une altération de l'équilibre entre les réponses vasodilatatrice et vasoconstrictrice induisant une contraction chronique et une augmentation des liaisons cellulaires irréversibles (Martinez-Lemus et al., 2004).

Le tonus vasculaire est étroitement lié au phénomène de remodelage vasculaire qui détermine sa direction (constrictif ou expansif) (Bakker et al., 2008a). Ainsi, notre second objectif a été d'étudier le remodelage vasculaire en cas d'exposition *in utero* au diabète maternel suite au changement chronique de pression ou de flux. Les vaisseaux sanguins sont en permanence sous contrainte en raison des forces de cisaillement perçues par l'endothélium et de la contrainte pariétale perçue par les CMVLs. Ces contraintes sont des déterminants majeurs de la composition et de la morphologie du vaisseau (Lehoux et al., 2004). Or, dans notre modèle, nous avons pu démontrer que, face à l'HTA observée, les DMO âgés ne développent aucun remodelage hypertrophique ou eutrophique aussi bien dans l'aorte que dans les artères mésentériques (Figure 31). Au niveau des artères de conductance (aorte), ces résultats pourraient être liés à l'augmentation des points d'ancrage des CMVLs à la MEC (Figure 31). D'ailleurs, dans les artères de conductance de rat spontanément hypertendu, il a été démontré que le réseau d'élastine jouait un rôle majeur dans l'adaptation mécanique de la paroi artérielle par des variations de l'étendue de l'ancrage des cellules musculaires (Bezie et al., 1998). Ainsi cette réorganisation des connections coordonnerait la tension des lames élastiques à la tension active globale des CMVLs (Davis, 1993a) et aboutirait à une diminution des forces appliquées à la paroi vasculaire par la

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



pression artérielle, permettant ainsi de normaliser la contrainte pariétale. Cette réorganisation matricielle plus solide pourrait donc être à l'origine de l'absence de remodelage. D'autre part, alors que l'augmentation de flux entraîne bien un remodelage expansif dans les artères de conductance (carotide) et dans les artères de résistance (artère mésentérique), la réduction du débit n'entraîne un remodelage constrictif que dans les gros vaisseaux (Figure 31). Le remodelage constrictif en réponse à des agents vasoconstricteurs, à l'HTA ou bien à la diminution chronique de flux, nécessite deux conditions : une vasoconstriction durable et la présence d'enzymes de réticulation pour fixer le vaisseau dans cet état (Bakker et al., 2002; Langille and Dajnowiec, 2005; Huelsz-Prince et al., 2013). Chez nos animaux issus de mères diabétiques, la première condition ne semble pas altérée puisque nous avons mis en évidence un important tonus vasoconstricteur. Par contre, la diminution de l'activité de la tTG (enzyme de réticulation des protéines) dans les artères de résistance pourrait expliquer l'absence de remodelage constrictif en cas de diminution de flux ou d'hypertension. En effet, un lien étroit entre remodelage des petites artères et activité de la tTG a été démontré en cas de diminution chronique de flux, d'hypertension ou suite à l'exposition à des agents vasoconstricteurs (Bakker et al., 2005, 2006). Ce remodelage, lorsqu'il est induit par l'ET-1 ou la Phe ou en réponse à une diminution chronique de flux sanguin au niveau des artères mésentériques, est bloqué par les inhibiteurs de la tTG (cystamine) (Bakker et al., 2005; Eftekhari et al., 2007). De plus, alors que chez des souris tTG<sup>+/+</sup>, le L-NAME induit un remodelage constrictif des petites artères en réponse à l'augmentation de la pression artérielle, chez les souris tTG<sup>-/-</sup>, ce remodelage est absent malgré l'augmentation de pression (Pistea et al., 2008). Bien que les voies par lesquelles la tTG exerce son effet sur le remodelage, ne sont pas clairement définies, cette enzyme pourrait jouer un rôle dans la résistance mécanique de la paroi du vaisseau en réponse à ces stimuli, par réticulation des protéines structurales de la MEC; de cette façon, la tTG pourrait figer l'artère contractée dans son état (Bakker et al., 2002; Langille and Dajnowiec, 2005). Au niveau des gros vaisseaux, les travaux récents de Santhanam et coll ont mis en évidence un lien étroit entre la formation de liaisons induites par la tTG et la rigidité des artères de conductance associée au vieillissement (Santhanam et al., 2010). Cette enzyme serait également impliquée dans la calcification vasculaire et le développement et la stabilité de la plaque d'athérome (Matlung et al., 2010; Vanbavel and Bakker, 2008). Pourtant la fonction de la tTG n'a pas été étudiée dans le remodelage des gros vaisseaux en réponse à l'HTA ou à une diminution du flux. Une seule étude montre une activité transglutaminase diminuée au niveau des gros vaisseaux chez le rat hypertendu (SHR et DOCA-sel) (Petersen-Jones et al., 2015), alors que nos résultats au niveau carotidien suite à une diminution chronique de flux, montrent une activité transglutaminase normale.

En conclusion, notre travail a mis en évidence des perturbations de la réactivité vasculaire associées à des modifications des mécanismes de remodelage. Ces résultats soulignent une programmation fœtale au niveau du système vasculaire chez le rats adulte exposé *in utero* au diabète maternel, qui pourrait être impliquée dans le développement de l'hypertension. La modification de la structure intrinsèque du vaisseau permettrait, dans un premier temps, de normaliser les contraintes engendrées par l'HTA. L'incapacité de nos

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

animaux DMO à faire un remodelage constrictif semblerait alors initialement protecteur puisque des études récentes indiquent que le remodelage des artères de résistance est l'un des premiers paramètres prédictibles des événements cardiovasculaires en contribuant à la progression de la maladie vasculaire dans des états pathologiques impliquant des altérations de la charge hémodynamique (Mathiassen et al., 2007; Rizzoni et al., 2003). L'hypertension observée dans notre modèle s'aggravant rapidement avec l'âge (Nehiri et al., 2008), l'absence de ce remodelage deviendrait délétère, les modifications structurales des vaisseaux ne permettant plus à eux seuls de normaliser les contraintes pariétales, avec des conséquences dramatiques sur les organes cibles compromettant leur fonction. Cette adaptation deviendrait inefficace pour contrebalancer les troubles vasculaires chez les DMO, altérant rapidement l'état de santé des animaux.

La programmation fœtale des maladies cardiovasculaires et plus particulièrement de l'HTA est la conséquence de modifications structurales et fonctionnelles à des périodes critiques du développement. L'intérêt de ce projet, a été d'identifier les facteurs à l'origine des anomalies vasculaires et les conséquences fonctionnelles qui en résultent à l'âge adulte. En terme de santé publique, une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques de cette re-programmation vasculaire et plus précisément des mécanismes vasculaires impliqués dans l'aggravation des pathologies cardiovasculaires permettrait 1) de mettre en place un suivi personnalisé en cas d'exposition *in utero* au diabète maternel et 2) de proposer des stratégies thérapeutiques pour une prise en charge précoce visant à contrôler les conséquences pathologiques d'une telle re-programmation.

# BIBLIOGRAPHIE

**Abdallah Dib** | Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Abi Khalil, C., Travert, F., Fetita, S., Rouzet, F., Porcher, R., Riveline, J.-P., Hadjadj, S., Larger, E., Roussel, R., Vexiau, P., et al. (2010). Fetal exposure to maternal type 1 diabetes is associated with renal dysfunction at adult age. *Diabetes* 59, 2631–2636.
- Aceti, A., Santhakumaran, S., Logan, K.M., Philipps, L.H., Prior, E., Gale, C., Hyde, M.J., and Modi, N. (2012). The diabetic pregnancy and offspring blood pressure in childhood: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 55, 3114–3127.
- Adami, H.-O., Laggiou, P., and Trichopoulos, D. (2012). Breast cancer following diethylstilbestrol exposure in utero: insights from a tragedy. *Eur. J. Epidemiol.* 27, 1–3.
- Alexander, B.T. (2003). Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 41, 457–462.
- Alonso, D., and Radomski, M.W. (2003). The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail. Rev.* 8, 107–115.
- Amri, K., Freund, N., Vilar, J., Merlet-Bénichou, C., and Lelièvre-Pégorier, M. (1999). Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes* 48, 2240–2245.
- Amri, K., Freund, N., Duong Van Huyen, J.P., Merlet-Bénichou, C., and Lelièvre-Pégorier, M. (2001). Altered nephrogenesis due to maternal diabetes is associated with increased expression of IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in the fetal kidney. *Diabetes* 50, 1069–1075.
- Armitage, J.A., Khan, I.Y., Taylor, P.D., Nathanielsz, P.W., and Poston, L. (2004). Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J. Physiol.* 561, 355–377.
- Auch-Schwelk, W., Katusic, Z.S., and Vanhoutte, P.M. (1990). Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 15, 699–703.
- Bacon, C.R., Cary, N.R., and Davenport, A.P. (1995). Distribution of endothelin receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 Suppl 3, S439–S441.
- Bakker, E.N.T.P., van der Meulen, E.T., van den Berg, B.M., Everts, V., Spaan, J.A.E., and VanBavel, E. (2002). Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J. Vasc. Res.* 39, 12–20.
- Bakker, E.N.T.P., Buus, C.L., VanBavel, E., and Mulvany, M.J. (2004). Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J. Vasc. Res.* 41, 174–182.
- Bakker, E.N.T.P., Buus, C.L., Spaan, J.A.E., Perree, J., Ganga, A., Rolf, T.M., Sorop, O., Bramsen, L.H., Mulvany, M.J., and Vanbavel, E. (2005). Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circ. Res.* 96, 119–126.
- Bakker, E.N.T.P., Pisteia, A., Spaan, J.A.E., Rolf, T., de Vries, C.J., van Rooijen, N., Candi, E., and VanBavel, E. (2006). Flow-dependent remodeling of small arteries in mice deficient for tissue-type transglutaminase: possible compensation by macrophage-derived factor XIII. *Circ. Res.* 99, 86–92.
- Bakker, E.N.T.P., Matlung, H.L., Bonta, P., de Vries, C.J., van Rooijen, N., and Vanbavel, E. (2008a). Blood flow-dependent arterial remodelling is facilitated by inflammation but directed by vascular tone. *Cardiovasc. Res.* 78, 341–348.
- Bakker, E.N.T.P., Pisteia, A., and VanBavel, E. (2008b). Transglutaminases in vascular biology: relevance for vascular remodeling and atherosclerosis. *J. Vasc. Res.* 45, 271–278.
- Ballas, J., Moore, T.R., and Ramos, G.A. (2012). Management of diabetes in pregnancy. *Curr. Diab. Rep.* 12, 33–42.
- Barker, D.J. (1997). Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 13, 807–813.
- Barker, D.J.P. (2005). The developmental origins of insulin resistance. *Horm. Res.* 64 Suppl 3, 2–7.
- Barker, D.J., and Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1077–1081.
- Barker, D.J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., and Wadsworth, M.E. (1989a). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298, 564–567.
- Barker, D.J., Winter, P.D., Osmond, C., Margetts, B., and Simmonds, S.J. (1989b). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet Lond. Engl.* 2, 577–580.
- Barker, D.J., Osmond, C., Simmonds, S.J., and Wield, G.A. (1993a). The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* 306, 422–426.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Barker, D.J., Hales, C.N., Fall, C.H., Osmond, C., Phipps, K., and Clark, P.M. (1993b). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62–67.
- Barker, D.J.P., Osmond, C., Kajantie, E., and Eriksson, J.G. (2009). Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann. Hum. Biol.* 36, 445–458.
- Baron-Menguy, C., Toutain, B., Cousin, M., Dumont, O., Guihot, A.-L., Vessières, E., Subra, J.-F., Custaud, M.-A., Loufrani, L., and Henrion, D. (2010). Involvement of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic decrease in blood flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 33, 857–866.
- Barrett-Connor, E., and Bush, T.L. (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 265, 1861–1867.
- Barton, C.H., Ni, Z., and Vaziri, N.D. (2001). Enhanced nitric oxide inactivation in aortic coarctation-induced hypertension. *Kidney Int.* 60, 1083–1087.
- Baumbach, G.L., and Heistad, D.D. (1989). Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13, 968–972.
- Becerra, J.E., Khoury, M.J., Cordero, J.F., and Erickson, J.D. (1990). Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics* 85, 1–9.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1620–1624.
- Benjamin, N., Dutton, J.A., and Ritter, J.M. (1991). Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 102, 847–850.
- Bezie, Y., Lacolley, P., Laurent, S., and Gabella, G. (1998). Connection of smooth muscle cells to elastic lamellae in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32, 166–169.
- Blanco-Rivero, J., Aras-López, R., Del Campo, L., Sagredo, A., Balfagón, G., and Ferrer, M. (2006). Orchidectomy increases beta-adrenoceptor activation-mediated neuronal nitric oxide and noradrenaline release in rat mesenteric artery. *Neuroendocrinology* 84, 378–385.
- Boekelheide, K., Blumberg, B., Chapin, R.E., Cote, I., Graziano, J.H., Janesick, A., Lane, R., Lillycrop, K., Myatt, L., States, J.C., et al. (2012). Predicting later-life outcomes of early-life exposures. *Environ. Health Perspect.* 120, 1353–1361.
- Boesen, E.I., and Pollock, D.M. (2007). Acute increases of renal medullary osmolality stimulate endothelin release from the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292, F185–F191.
- Bogdarina, I., Murphy, H.C., Burns, S.P., and Clark, A.J.L. (2004). Investigation of the role of epigenetic modification of the rat glucokinase gene in fetal programming. *Life Sci.* 74, 1407–1415.
- Boney, C.M., Verma, A., Tucker, R., and Vohr, B.R. (2005). Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115, e290–e296.
- Bonnet, S., Paulin, R., Sutendra, G., Dromparis, P., Roy, M., Watson, K.O., Nagendran, J., Haromy, A., Dyck, J.R.B., and Michelakis, E.D. (2009). Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3-β/NFAT axis. *Circulation* 120, 1231–1240.
- Boo, Y.C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J., and Jo, H. (2002). Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 277, 3388–3396.
- Boubred, F., Buffat, C., Feuerstein, J.-M., Daniel, L., Tsimaratos, M., Oliver, C., Lelièvre-Pégorier, M., and Simeoni, U. (2007). Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F1944–F1949.
- Boumaza, S., Arribas, S.M., Osborne-Pellegrin, M., McGrath, J.C., Laurent, S., Lacolley, P., and Challande, P. (2001). Fenestrations of the carotid internal elastic lamina and structural adaptation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 37, 1101–1107.
- Bouvet, C., Belin de Chantemèle, E., Guihot, A.-L., Vessières, E., Bocquet, A., Dumont, O., Jardel, A., Loufrani, L., Moreau, P., and Henrion, D. (2007). Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension* 50, 248–254.
- Bouwens, L., and Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol. Rev.* 85, 1255–1270.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Brenner, B.M., Garcia, D.L., and Anderson, S. (1988). Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am. J. Hypertens.* 1, 335–347.
- Bunt, J.C., Tataranni, P.A., and Salbe, A.D. (2005). Intrauterine exposure to diabetes is a determinant of hemoglobin A(1)c and systolic blood pressure in pima Indian children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 3225–3229.
- Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S., and Vane, J.R. (1976). Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* 12, 897–913.
- Burdge, G.C., Lillycrop, K.A., and Jackson, A.A. (2009). Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? *Br. J. Nutr.* 101, 619–630.
- Busse, R., Edwards, G., Félétou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M., and Weston, A.H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 374–380.
- del Campo, L., Guvenç Tuna, B., Ferrer, M., van Bavel, E., and Bakker, E.N.T.P. (2013). Testosterone and  $\beta$ -oestradiol prevent inward remodelling of rat small mesenteric arteries: role of NO and transglutaminase. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 124, 719–728.
- do Carmo Pinho Franco, M., Nigro, D., Fortes, Z.B., Tostes, R.C.A., Carvalho, M.H.C., Lucas, S.R.R., Gomes, G.N., Coimbra, T.M., and Gil, F.Z. (2003). Intrauterine undernutrition--renal and vascular origin of hypertension. *Cardiovasc. Res.* 60, 228–234.
- Carter, S.K., Broder, L., and Friedman, M. (1971). Streptozotocin and metastatic insulinoma. *Ann. Intern. Med.* 74, 445–446.
- Casson, I.F., Clarke, C.A., Howard, C.V., McKendrick, O., Pennycook, S., Pharoah, P.O., Platt, M.J., Stanisstreet, M., van Velszen, D., and Walkinshaw, S. (1997). Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ* 315, 275–278.
- Castier, Y., Brandes, R.P., Leseche, G., Tedgui, A., and Lehoux, S. (2005). p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ. Res.* 97, 533–540.
- Castorena-Gonzalez, J.A., Staiculescu, M.C., Foote, C., and Martinez-Lemus, L.A. (2014). Mechanisms of the inward remodeling process in resistance vessels: is the actin cytoskeleton involved? *Microcirc. N. Y. N* 1994 21, 219–229.
- Catalano, P.M., Thomas, A., Huston-Presley, L., and Amini, S.B. (2003). Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189, 1698–1704.
- Cavanal, M. de F., Gomes, G.N., Forti, A.L., Rocha, S.O., Franco, M. do C.P., Fortes, Z.B., and Gil, F.Z. (2007). The influence of L-arginine on blood pressure, vascular nitric oxide and renal morphometry in the offspring from diabetic mothers. *Pediatr. Res.* 62, 145–150.
- Celermajer, D.S. (1997). Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J. Am. Coll. Cardiol.* 30, 325–333.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1993). Pregnancy complications and perinatal outcomes among women with diabetes--North Carolina, 1989-1990. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 42, 847–851.
- Chabrashvili, T., Tojo, A., Onozato, M.L., Kitiyakara, C., Quinn, M.T., Fujita, T., Welch, W.J., and Wilcox, C.S. (2002). Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 39, 269–274.
- Chandramohan, G., Bai, Y., Norris, K., Rodriguez-Iturbe, B., and Vaziri, N.D. (2008). Effects of dietary salt on intrarenal angiotensin system, NAD(P)H oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 expressions and NF-kappaB activity in salt-sensitive and -resistant rat kidneys. *Am. J. Nephrol.* 28, 158–167.
- Chantler, P.D., and Frisbee, J.C. (2015). Arterial function in cardio-metabolic diseases: from the microcirculation to the large conduits. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 57, 489–496.
- Chiang, E.-P.I., Wang, Y.-C., Chen, W.-W., and Tang, F.-Y. (2009). Effects of insulin and glucose on cellular metabolic fluxes in homocysteine transsulfuration, remethylation, S-adenosylmethionine synthesis, and global deoxyribonucleic acid methylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1017–1025.
- Chugh, S.S., Wallner, E.I., and Kanwar, Y.S. (2003). Renal development in high-glucose ambience and diabetic embryopathy. *Semin. Nephrol.* 23, 583–592.
- Cleasby, M.E., Kelly, P.A.T., Walker, B.R., and Seckl, J.R. (2003). Programming of rat muscle and fat metabolism by in utero overexposure to glucocorticoids. *Endocrinology* 144, 999–1007.

- Clifton, V.L. (2005). Sexually dimorphic effects of maternal asthma during pregnancy on placental glucocorticoid metabolism and fetal growth. *Cell Tissue Res.* 322, 63–71.
- Collin, S., and Levy, B. (2008). pathophysiological mechanisms of vascular hyporesponsiveness in shock states.
- Cousin, M., Custaud, M.-A., Baron-Menguy, C., Toutain, B., Dumont, O., Guihot, A.-L., Vessières, E., Subra, J.-F., Henrion, D., and Loufrani, L. (2010). Role of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 55, 109–115.
- Dall'Ago, P., Silva, V.O.K., De Angelis, K.L.D., Irigoyen, M.C., Fazan, R., and Salgado, H.C. (2002). Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica AI* 35, 843–849.
- Danser, A.J., and Nguyen, G. (2008). The Renin Academy Summit: advancing the understanding of renin science. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS* 9, 119–123.
- Dauphiné, D.C., Ferreccio, C., Guntur, S., Yuan, Y., Hammond, S.K., Balmes, J., Smith, A.H., and Steinmaus, C. (2011). Lung function in adults following in utero and childhood exposure to arsenic in drinking water: preliminary findings. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 84, 591–600.
- Davenport, A.P., Kuc, R.E., Maguire, J.J., and Harland, S.P. (1995). ETA receptors predominate in the human vasculature and mediate constriction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 Suppl 3, S265–S267.
- Davis, E.C. (1993a). Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 68, 89–99.
- Davis, M.J. (1993b). Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am. J. Physiol.* 264, H2168–H2179.
- Davis, M.J., and Hill, M.A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol. Rev.* 79, 387–423.
- Davis, E.M., Peck, J.D., Thompson, D., Wild, R.A., and Langlois, P. (2010). Maternal diabetes and renal agenesis/dysgenesis. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 88, 722–727.
- Delaney, C.A., Dunger, A., Di Matteo, M., Cunningham, J.M., Green, M.H., and Green, I.C. (1995). Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem. Pharmacol.* 50, 2015–2020.
- Delpy, E., Coste, H., and Gouville, A.C. (1996). Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br. J. Pharmacol.* 119, 471–478.
- De Mey, J.G.R., Schiffers, P.M., Hilgers, R.H.P., and Sanders, M.M.W. (2005). Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1022–H1027.
- Demirel, E., Ugur, O., and Onaran, H.O. (1998). Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of adenylyl cyclase in turkey erythrocyte membranes. *Pharmacology* 57, 222–228.
- Dodic, M., Abouantoun, T., O'Connor, A., Wintour, E.M., and Moritz, K.M. (2002). Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 40, 729–734.
- Duckles, S.P., and Miller, V.M. (2010). Hormonal modulation of endothelial NO production. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 841–851.
- Duhl, D.M., Stevens, M.E., Vrieling, H., Saxon, P.J., Miller, M.W., Epstein, C.J., and Barsh, G.S. (1994). Pleiotropic effects of the mouse lethal yellow (Ay) mutation explained by deletion of a maternally expressed gene and the simultaneous production of agouti fusion RNAs. *Dev. Camb. Engl.* 120, 1695–1708.
- Dumont, O., Loufrani, L., and Henrion, D. (2007). Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 317–324.
- Dumont, O., Pinaud, F., Guihot, A.-L., Baufreton, C., Loufrani, L., and Henrion, D. (2008). Alteration in flow (shear stress)-induced remodelling in rat resistance arteries with aging: improvement by a treatment with hydralazine. *Cardiovasc. Res.* 77, 600–608.



- Duong Van Huyen, J.-P., Amri, K., Bélair, M.-F., Vilar, J., Merlet-Bénichou, C., Bruneval, P., and Lelièvre-Pégorier, M. (2003). Spatiotemporal distribution of insulin-like growth factor receptors during nephrogenesis in fetuses from normal and diabetic rats. *Cell Tissue Res.* 314, 367–379.
- Duong Van Huyen, J.-P., Vessières, E., Perret, C., Troise, A., Prince, S., Guihot, A.-L., Barbry, P., Henrion, D., Bruneval, P., Laurent, S., et al. (2010). In utero exposure to maternal diabetes impairs vascular expression of prostacyclin receptor in rat offspring. *Diabetes* 59, 2597–2602.
- Eftekhari, A., Rahman, A., Schaebel, L.H., Chen, H., Rasmussen, C.V., Aalkjaer, C., Buus, C.L., and Mulvany, M.J. (2007). Chronic cystamine treatment inhibits small artery remodelling in rats. *J. Vasc. Res.* 44, 471–482.
- Eleazu, C.O., Eleazu, K.C., Chukwuma, S., and Essien, U.N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12, 60.
- El-Mas, M.M., Afify, E.A., Omar, A.G., Mohy El-Din, M.M., and Sharabi, F.M. (2003). Testosterone depletion contributes to cyclosporine-induced chronic impairment of acetylcholine renovascular relaxations. *Eur. J. Pharmacol.* 468, 217–224.
- Engholm, M., Eftekhari, A., Chwatko, G., Bald, E., and Mulvany, M.J. (2011). Effect of cystamine on blood pressure and vascular characteristics in spontaneously hypertensive rats. *J. Vasc. Res.* 48, 476–484.
- Fan, Z., Zhang, Z.-X., Li, Y., Wang, Z., Xu, T., Gong, X., Zhou, X., Wen, H., and Zeng, Y. (2010). Relationship between birth size and coronary heart disease in China. *Ann. Med.* 42, 596–602.
- Félétou, M., Huang, Y., and Vanhoutte, P.M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br. J. Pharmacol.* 164, 894–912.
- Fetalvero, K.M., Shyu, M., Nomikos, A.P., Chiu, Y.-F., Wagner, R.J., Powell, R.J., Hwa, J., and Martin, K.A. (2006). The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1337–H1346.
- Flamant, M., Placier, S., Dubroca, C., Esposito, B., Lopes, I., Chatziantoniou, C., Tedgui, A., Dussaule, J.-C., and Lehoux, S. (2007). Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 50, 212–218.
- Flammer, A.J., and Lüscher, T.F. (2010). Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 1005–1013.
- Forman, H.J., and Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.* 22, 189–216.
- Forsén, T., Osmond, C., Eriksson, J.G., and Barker, D.J.P. (2004). Growth of girls who later develop coronary heart disease. *Heart Br. Card. Soc.* 90, 20–24.
- Fowden, A.L. (1992). The role of insulin in fetal growth. *Early Hum. Dev.* 29, 177–181.
- Franco, M. do C.P., Arruda, R.M.M.P., Dantas, A.P.V., Kawamoto, E.M., Fortes, Z.B., Scavone, C., Carvalho, M.H.C., Tostes, R.C.A., and Nigro, D. (2002). Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc. Res.* 56, 145–153.
- Francois, H., Athirakul, K., Howell, D., Dash, R., Mao, L., Kim, H.-S., Rockman, H.A., Fitzgerald, G.A., Koller, B.H., and Coffman, T.M. (2005). Prostacyclin protects against elevated blood pressure and cardiac fibrosis. *Cell Metab.* 2, 201–207.
- Frangos, J.A., Eskin, S.G., McIntire, L.V., and Ives, C.L. (1985). Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227, 1477–1479.
- Frontini, M.G., Srinivasan, S.R., Xu, J., and Berenson, G.S. (2004). Low birth weight and longitudinal trends of cardiovascular risk factor variables from childhood to adolescence: the bogalusa heart study. *BMC Pediatr.* 4, 22.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Galliano, D., and Bellver, J. (2013). Female obesity: short- and long-term consequences on the offspring. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 29, 626–631.
- Gallou-Kabani, C., Gabory, A., Tost, J., Karimi, M., Mayeur, S., Lesage, J., Boudadi, E., Gross, M.-S., Taurelle, J., Vigé, A., et al. (2010). Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One* 5, e14398.
- Gauguier, D., Bihoreau, M.T., Ktorza, A., Berthault, M.F., and Picon, L. (1990). Inheritance of diabetes mellitus as consequence of gestational hyperglycemia in rats. *Diabetes* 39, 734–739.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Geller, D.A., and Billiar, T.R. (1998). Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 7–23.
- Gerber, R.T., Holemans, K., O'Brien-Coker, I., Mallet, A.I., van Bree, R., Van Assche, F.A., and Poston, L. (2000). Increase of the isoprostane 8-isoprostaglandin f2alpha in maternal and fetal blood of rats with streptozotocin-induced diabetes: evidence of lipid peroxidation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, 1035–1040.
- Ghulmiyyah, L.M., Costantine, M.M., Yin, H., Tamayo, E., Clark, S.M., Hankins, G.D.V., Saade, G.R., and Longo, M. (2011). The role of oxidative stress in the developmental origin of adult hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 205, 155.e7–e11.
- Gibbons, G.H., and Dzau, V.J. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.* 330, 1431–1438.
- Gicquel, C., El-Osta, A., and Le Bouc, Y. (2008). Epigenetic regulation and fetal programming. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22, 1–16.
- Gilbert, J.S., Ford, S.P., Lang, A.L., Pahl, L.R., Drumhiller, M.C., Babcock, S.A., Nathanielsz, P.W., and Nijland, M.J. (2007). Nutrient restriction impairs nephrogenesis in a gender-specific manner in the ovine fetus. *Pediatr. Res.* 61, 42–47.
- Gill-Randall, R., Adams, D., Ollerton, R.L., Lewis, M., and Alcolado, J.C. (2004). Type 2 diabetes mellitus—genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. *Diabetologia* 47, 1354–1359.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Buklijas, T., Low, F.M., and Beedle, A.S. (2009). Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 401–408.
- Goldstein, B.J. (2002). Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 90, 3G – 10G.
- Gomes, G.N., and Gil, F.Z. (2011). Prenatally programmed hypertension: role of maternal diabetes. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica AI* 44, 899–904.
- Greenhill, N.S., and Stehens, W.E. (1987). Scanning electron microscopic investigation of the afferent arteries of experimental femoral arteriovenous fistulae in rabbits. *Pathology (Phila.)* 19, 22–27.
- Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., and Alexander, R.W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74, 1141–1148.
- Griendling, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86, 494–501.
- Griffin, M., Casadio, R., and Bergamini, C.M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.* 368, 377–396.
- Grigore, D., Ojeda, N.B., and Alexander, B.T. (2008). Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gend. Med.* 5 *Suppl A*, S121–S132.
- Grote, K., Flach, I., Luchtefeld, M., Akin, E., Holland, S.M., Drexler, H., and Schieffer, B. (2003). Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ. Res.* 92, e80–e86.
- Gustafsson, P., and Källén, K. (2011). Perinatal, maternal, and fetal characteristics of children diagnosed with attention-deficit-hyperactivity disorder: results from a population-based study utilizing the Swedish Medical Birth Register. *Dev. Med. Child Neurol.* 53, 263–268.
- Guzman, R.J., Abe, K., and Zarins, C.K. (1997). Flow-induced arterial enlargement is inhibited by suppression of nitric oxide synthase activity in vivo. *Surgery* 122, 273–279; discussion 279–280.
- Hadjjiisky, P., Peyri, N., and Grosogeat, Y. (1987). Tunica media changes in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Atherosclerosis* 65, 125–137.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 60, 5–20.
- Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 91, 7A – 11A.
- Heerkens, E.H.J., Shaw, L., Ryding, A., Brooker, G., Mullins, J.J., Austin, C., Ohanian, V., and Heagerty, A.M. (2006). alphaV integrins are necessary for eutrophic inward remodeling of small arteries in hypertension. *Hypertension* 47, 281–287.

- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., and Lumey, L.H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17046–17049.
- Heil, M., and Schaper, W. (2004). Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ. Res.* *95*, 449–458.
- Heinonen, K., Räikkönen, K., Pesonen, A.-K., Andersson, S., Kajantie, E., Eriksson, J.G., Wolke, D., and Lano, A. (2011). Longitudinal study of smoking cessation before pregnancy and children's cognitive abilities at 56 months of age. *Early Hum. Dev.* *87*, 353–359.
- Hemmings, D.G., Williams, S.J., and Davidge, S.T. (2005). Increased myogenic tone in 7-month-old adult male but not female offspring from rat dams exposed to hypoxia during pregnancy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *289*, H674–H682.
- Hickey, K.A., Rubanyi, G., Paul, R.J., and Highsmith, R.F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* *248*, C550–C556.
- Hillier, T.A., Pedula, K.L., Schmidt, M.M., Mullen, J.A., Charles, M.-A., and Pettitt, D.J. (2007). Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care* *30*, 2287–2292.
- Hlubocká, Z., Umnerová, V., Heller, S., Peleska, J., Jindra, A., Jáchymová, M., Kvasnicka, J., Horký, K., and Aschermann, M. (2002). Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: the effect of treatment with ACE inhibitors. *J. Hum. Hypertens.* *16*, 557–562.
- Hokke, S.N., Armitage, J.A., Puelles, V.G., Short, K.M., Jones, L., Smyth, I.M., Bertram, J.F., and Cullen-McEwen, L.A. (2013). Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy. *PLoS One* *8*, e58243.
- Holemans, K., Van Bree, R., Verhaeghe, J., Aerts, L., and Van Assche, F.A. (1993). In vivo glucose utilization by individual tissues in virgin and pregnant offspring of severely diabetic rats. *Diabetes* *42*, 530–536.
- Holemans, K., Van Bree, R., Verhaeghe, J., Meurrens, K., and Van Assche, F.A. (1997). Maternal semistarvation and streptozotocin-diabetes in rats have different effects on the in vivo glucose uptake by peripheral tissues in their female adult offspring. *J. Nutr.* *127*, 1371–1376.
- Holemans, K., Gerber, R.T., Meurrens, K., De Clerck, F., Poston, L., and Van Assche, F.A. (1999). Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* *42*, 81–89.
- Holliday, R., and Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* *187*, 226–232.
- Huelsz-Prince, G., Belkin, A.M., VanBavel, E., and Bakker, E.N.T.P. (2013). Activation of extracellular transglutaminase 2 by mechanical force in the arterial wall. *J. Vasc. Res.* *50*, 383–395.
- Hughson, M.D., Douglas-Denton, R., Bertram, J.F., and Hoy, W.E. (2006). Hypertension, glomerular number, and birth weight in African Americans and white subjects in the southeastern United States. *Kidney Int.* *69*, 671–678.
- Hull, S.S., Kaiser, L., Jaffe, M.D., and Sparks, H.V. (1986). Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood Vessels* *23*, 183–198.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* *88*, 131–141.
- Huxley, R.R., Shiell, A.W., and Law, C.M. (2000). The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J. Hypertens.* *18*, 815–831.
- Ignarro, L.J. (1989). Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *3*, 31–36.
- Ii, M., Hoshiga, M., Negoro, N., Fukui, R., Nakakoji, T., Kohbayashi, E., Shibata, N., Furutama, D., Ishihara, T., Hanafusa, T., et al. (2009). Adrenal androgen dehydroepiandrosterone sulfate inhibits vascular remodeling following arterial injury. *Atherosclerosis* *206*, 77–85.
- Ingelfinger, J.R., and Woods, L.L. (2002). Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am. J. Hypertens.* *15*, 46S – 49S.

- Ingram, D.A., Lien, I.Z., Mead, L.E., Estes, M., Prater, D.N., Derr-Yellin, E., DiMeglio, L.A., and Haneline, L.S. (2008). In vitro hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cell numbers and function. *Diabetes* 57, 724–731.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2863–2867.
- Intengan, H.D., and Schiffrin, E.L. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581–587.
- Ishihara, G., Hiramatsu, Y., Masuyama, H., and Kudo, T. (2000). Streptozotocin-induced diabetic pregnant rats exhibit signs and symptoms mimicking preeclampsia. *Metabolism*. 49, 853–857.
- Järvelin, M.-R., Sovio, U., King, V., Lauren, L., Xu, B., McCarthy, M.I., Hartikainen, A.-L., Laitinen, J., Zitting, P., Rantakallio, P., et al. (2004). Early life factors and blood pressure at age 31 years in the 1966 northern Finland birth cohort. *Hypertension* 44, 838–846.
- Jensen, D.M., Damm, P., Moelsted-Pedersen, L., Ovesen, P., Westergaard, J.G., Moeller, M., and Beck-Nielsen, H. (2004). Outcomes in type 1 diabetic pregnancies: a nationwide, population-based study. *Diabetes Care* 27, 2819–2823.
- Jiménez-Chillarrón, J.C., Díaz, R., Martínez, D., Pentinat, T., Ramón-Krauel, M., Ribó, S., and Plösch, T. (2012). The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 94, 2242–2263.
- Joannides, R., Haefeli, W.E., Linder, L., Richard, V., Bakkali, E.H., Thüillez, C., and Lüscher, T.F. (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91, 1314–1319.
- Johansson, E.B., and Tjalve, H. (1978). Studies on the tissue-disposition and fate of [<sup>14</sup>C]streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 89, 339–351.
- Jones, A., Beda, A., Osmond, C., Godfrey, K.M., Simpson, D.M., and Phillips, D.I.W. (2008). Sex-specific programming of cardiovascular physiology in children. *Eur. Heart J.* 29, 2164–2170.
- Jones, J.E., Jurgens, J.A., Evans, S.A., Ennis, R.C., Villar, V.A.M., and Jose, P.A. (2012). Mechanisms of fetal programming in hypertension. *Int. J. Pediatr.* 2012, 584831.
- Joss-Moore, L.A., and Lane, R.H. (2009). The developmental origins of adult disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 21, 230–234.
- Jousse, C., Parry, L., Lambert-Langlais, S., Maurin, A.-C., Averous, J., Bruhat, A., Carraro, V., Tost, J., Letteron, P., Chen, P., et al. (2011). Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 3271–3278.
- Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., and Renold, A.E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48, 2129–2139.
- Kanwar, Y.S., Liu, Z.Z., Kumar, A., Usman, M.I., Wada, J., and Wallner, E.I. (1996). D-glucose-induced dysmorphogenesis of embryonic kidney. *J. Clin. Invest.* 98, 2478–2488.
- Karunanayake, E.H., Hearse, D.J., and Mellows, G. (1974). The synthesis of [<sup>14</sup>C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem. J.* 142, 673–683.
- Karwowski, J.K., Markezich, A., Whitson, J., Abbruzzese, T.A., Zarins, C.K., and Dalman, R.L. (1999). Dose-dependent limitation of arterial enlargement by the matrix metalloproteinase inhibitor RS-113,456. *J. Surg. Res.* 87, 122–129.
- Katkhuda, R., Peterson, E.S., Roghair, R.D., Norris, A.W., Scholz, T.D., and Segar, J.L. (2012). Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. *Pediatr. Res.* 72, 352–361.
- Katusic, Z.S., and Vanhoutte, P.M. (1989). Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am. J. Physiol.* 257, H33–H37.
- Kauffenstein, G., Tamareille, S., Prunier, F., Roy, C., Ayer, A., Toutain, B., Billaud, M., Isakson, B.E., Grimaud, L., Loufrani, L., et al. (2016). Central Role of P2Y6 UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*
- Keller, G., Zimmer, G., Mall, G., Ritz, E., and Amann, K. (2003). Nephron number in patients with primary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 348, 101–108.
- Khalyfa, A., Carreras, A., Hakim, F., Cunningham, J.M., Wang, Y., and Gozal, D. (2013). Effects of late gestational high-fat diet on body weight, metabolic regulation and adipokine expression in offspring. *Int. J. Obes.* 2005 37, 1481–1489.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Khan, I.Y., Taylor, P.D., Dekou, V., Seed, P.T., Lakasing, L., Graham, D., Dominiczak, A.F., Hanson, M.A., and Poston, L. (2003). Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 41, 168–175.
- Ko, E.A., Amiri, F., Pandey, N.R., Javeshghani, D., Leibovitz, E., Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. (2007). Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H1789–H1795.
- Ktorza, A., Girard, J.R., Kinebanyan, M.F., and Picon, L. (1981). Hyperglycaemia induced by glucose infusion in the unrestrained pregnant rat during the last three days of gestation: metabolic and hormonal changes in the mother and the fetuses. *Diabetologia* 21, 569–574.
- Kumar, S., Vasudeva, N., and Sharma, S. (2012). GC-MS analysis and screening of antidiabetic, antioxidant and hypolipidemic potential of *Cinnamomum tamala* oil in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats. *Cardiovasc. Diabetol.* 11, 95.
- Kwak, B.R., Bäck, M., Bochaton-Piallat, M.-L., Caligiuri, G., Daemen, M.J.A.P., Davies, P.F., Hoefler, I.E., Holvoet, P., Jo, H., Krams, R., et al. (2014). Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *Eur. Heart J.* 35, 3013–3020, 3020a – 3020d.
- Kwong, W.Y., Wild, A.E., Roberts, P., Willis, A.C., and Fleming, T.P. (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Dev. Camb. Engl.* 127, 4195–4202.
- Lahti, J., Räikkönen, K., Kajantie, E., Heinonen, K., Pesonen, A.-K., Järvenpää, A.-L., and Strandberg, T. (2006). Small body size at birth and behavioural symptoms of ADHD in children aged five to six years. *J. Child Psychol. Psychiatry* 47, 1167–1174.
- Lahti, J., Räikkönen, K., Pesonen, A.-K., Heinonen, K., Kajantie, E., Forsén, T., Osmond, C., Barker, D.J.P., and Eriksson, J.G. (2010). Prenatal growth, postnatal growth and trait anxiety in late adulthood - the Helsinki Birth Cohort Study. *Acta Psychiatr. Scand.* 121, 227–235.
- Lamireau, D., Nuyt, A.M., Hou, X., Bernier, S., Beauchamp, M., Gobeil, F., Lahaie, I., Varma, D.R., and Chemtob, S. (2002). Altered vascular function in fetal programming of hypertension. *Stroke J. Cereb. Circ.* 33, 2992–2998.
- Langille, B.L., and Dajnowiec, D. (2005). Cross-linking vasomotor tone and vascular remodeling: a novel function for tissue transglutaminase? *Circ. Res.* 96, 9–11.
- Langille, B.L., and O'Donnell, F. (1986). Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 231, 405–407.
- Langille, B.L., Bendeck, M.P., and Keeley, F.W. (1989). Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow. *Am. J. Physiol.* 256, H931–H939.
- Langley-Evans, S.C., Gardner, D.S., and Jackson, A.A. (1996). Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Nutr.* 126, 1578–1585.
- Lehnen, H., Zechner, U., and Haaf, T. (2013). Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 415–422.
- Lehoux, S., Tronc, F., and Tedgui, A. (2002). Mechanisms of blood flow-induced vascular enlargement. *Biorheology* 39, 319–324.
- Lehoux, S., Lemarié, C.A., Esposito, B., Lijnen, H.R., and Tedgui, A. (2004). Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 109, 1041–1047.
- Lelièvre-Pégorier, M., Vilar, J., Ferrier, M.L., Moreau, E., Freund, N., Gilbert, T., and Merlet-Bénichou, C. (1998). Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int.* 54, 1455–1462.
- Levy, B.I., Ambrosio, G., Pries, A.R., and Struijker-Boudier, H.A. (2001). Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation* 104, 735–740.
- Lillycrop, K.A., Phillips, E.S., Jackson, A.A., Hanson, M.A., and Burdge, G.C. (2005). Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J. Nutr.* 135, 1382–1386.
- Lillycrop, K.A., Phillips, E.S., Torrens, C., Hanson, M.A., Jackson, A.A., and Burdge, G.C. (2008). Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br. J. Nutr.* 100, 278–282.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat



- Lithell, H.O., McKeigue, P.M., Berglund, L., Mohsen, R., Lithell, U.B., and Leon, D.A. (1996). Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ* 312, 406–410.
- Loaiza, S., Coustasse, A., Urrutia-Rojas, X., and Atalah, E. (2011). Birth weight and obesity risk at first grade in a cohort of Chilean children. *Nutr. Hosp.* 26, 214–219.
- Loria, A., Reverte, V., Salazar, F., Saez, F., Llinas, M.T., and Salazar, F.J. (2007). Sex and age differences of renal function in rats with reduced ANG II activity during the nephrogenic period. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F506–F510.
- Loufrani, L., and Henrion, D. (2008). Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Med. Biol. Eng. Comput.* 46, 451–460.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., and Wilkison, W.O. (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371, 799–802.
- Luo, Z.C., Fraser, W.D., Julien, P., Deal, C.L., Audibert, F., Smith, G.N., Xiong, X., and Walker, M. (2006). Tracing the origins of “fetal origins” of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med. Hypotheses* 66, 38–44.
- Lüscher, T.F., Aarhus, L.L., and Vanhoutte, P.M. (1990). Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Hypertens.* 3, 55–58.
- Malek, A.M., Alper, S.L., and Izumo, S. (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282, 2035–2042.
- Maloney, C.A., Hay, S.M., Young, L.E., Sinclair, K.D., and Rees, W.D. (2011). A methyl-deficient diet fed to rat dams during the peri-conception period programs glucose homeostasis in adult male but not female offspring. *J. Nutr.* 141, 95–100.
- Manderson, J.G., Mullan, B., Patterson, C.C., Hadden, D.R., Traub, A.I., and McCance, D.R. (2002). Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetologia* 45, 991–996.
- Manikkam, M., Crespi, E.J., Doop, D.D., Herkimer, C., Lee, J.S., Yu, S., Brown, M.B., Foster, D.L., and Padmanabhan, V. (2004). Fetal programming: prenatal testosterone excess leads to fetal growth retardation and postnatal catch-up growth in sheep. *Endocrinology* 145, 790–798.
- Mao, J., Zhang, X., Sieli, P.T., Falduto, M.T., Torres, K.E., and Rosenfeld, C.S. (2010). Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5557–5562.
- Martin, M.E., Garcia, A.M., Blanco, L., Herrera, E., and Salinas, M. (1995). Effect of streptozotocin diabetes on polysomal aggregation and protein synthesis rate in the liver of pregnant rats and their offspring. *Biosci. Rep.* 15, 15–20.
- Martinez-Lemus, L.A., Hill, M.A., Bolz, S.S., Pohl, U., and Meininger, G.A. (2004). Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 708–710.
- Martinez-Lemus, L.A., Zhao, G., Galinanes, E.L., and Boone, M. (2011). Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *AJP Heart Circ. Physiol.* 300, H2005–H2015.
- Martyn, C.N., and Greenwald, S.E. (1997). Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension. *Lancet Lond. Engl.* 350, 953–955.
- Mathiassen, O.N., Buus, N.H., Sihm, I., Thybo, N.K., Mørn, B., Schroeder, A.P., Thygesen, K., Aalkjaer, C., Lederballe, O., Mulvany, M.J., et al. (2007). Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J. Hypertens.* 25, 1021–1026.
- Matlung, H.L., Bakker, E.N.T.P., and VanBavel, E. (2009). Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1699–1709.
- Matlung, H.L., VanBavel, E., van den Akker, J., de Vries, C.J.M., and Bakker, E.N.T.P. (2010). Role of transglutaminases in cuff-induced atherosclerotic lesion formation in femoral arteries of ApoE3 Leiden mice. *Atherosclerosis* 213, 77–84.
- Matrougui, K., Lévy, B.I., and Henrion, D. (2000). Tissue angiotensin II and endothelin-1 modulate differently the response to flow in mesenteric resistance arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 130, 521–526.
- McMillen, I.C., and Robinson, J.S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol. Rev.* 85, 571–633.
- McMullen, S., and Langley-Evans, S.C. (2005). Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R85–R90.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Meng, Q., Mäkinen, V.-P., Luk, H., and Yang, X. (2013). Systems Biology Approaches and Applications in Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* 7, 73–83.
- Merlet-Bénichou, C. (1999). Influence of fetal environment on kidney development. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 453–456.
- Micke, G.C., Sullivan, T.M., Gattford, K.L., Owens, J.A., and Perry, V.E.A. (2010). Nutrient intake in the bovine during early and mid-gestation causes sex-specific changes in progeny plasma IGF-I, liveweight, height and carcass traits. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 208–217.
- Miller, V.M., and Burnett, J.C. (1992). Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am. J. Physiol.* 263, H103–H108.
- Miltenberger, R.J., Mynatt, R.L., Wilkinson, J.E., and Woychik, R.P. (1997). The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J. Nutr.* 127, 1902S – 1907S.
- Mingrone, G., Manco, M., Mora, M.E.V., Guidone, C., Iaconelli, A., Gniuli, D., Leccesi, L., Chiellini, C., and Ghirlanda, G. (2008). Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. *Diabetes Care* 31, 1872–1876.
- Minnes, S., Lang, A., and Singer, L. (2011). Prenatal tobacco, marijuana, stimulant, and opiate exposure: outcomes and practice implications. *Addict. Sci. Clin. Pract.* 6, 57–70.
- Miyashiro, J.K., Poppa, V., and Berk, B.C. (1997). Flow-induced vascular remodeling in the rat carotid artery diminishes with age. *Circ. Res.* 81, 311–319.
- Moncada, S., Higgs, E.A., and Vane, J.R. (1977). Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet Lond. Engl.* 1, 18–20.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Morello, F., Perino, A., and Hirsch, E. (2009). Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc. Res.* 82, 261–271.
- Mueller, B.R., and Bale, T.L. (2007). Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. *Physiol. Behav.* 91, 55–65.
- Mulay, S., Philip, A., and Solomon, S. (1983). Influence of maternal diabetes on fetal rat development: alteration of insulin receptors in fetal liver and lung. *J. Endocrinol.* 98, 401–410.
- Mulvany, M.J. (2002). Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 17, 105–109.
- Mulvany, M.J., Baumbach, G.L., Aalkjaer, C., Heagerty, A.M., Korsgaard, N., Schiffrin, E.L., and Heistad, D.D. (1996). Vascular remodeling. *Hypertension* 28, 505–506.
- Nakajima, M., Hutchinson, H.G., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (1995). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10663–10667.
- Nava, M., Quiroz, Y., Vaziri, N., and Rodriguez-Iturbe, B. (2003). Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284, F447–F454.
- Nehiri, T., Duong Van Huyen, J.-P., Viltard, M., Fassot, C., Heudes, D., Freund, N., Deschênes, G., Houillier, P., Bruneval, P., and Lelièvre-Pégorier, M. (2008). Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes* 57, 2167–2175.
- Nelson, R.G., Morgenstern, H., and Bennett, P.H. (1998). Intrauterine diabetes exposure and the risk of renal disease in diabetic Pima Indians. *Diabetes* 47, 1489–1493.
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., and Jefferson, W.N. (2009). Environmental estrogens and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 84–89.
- Nivoit, P., Morens, C., Van Assche, F.A., Jansen, E., Poston, L., Remacle, C., and Reusens, B. (2009). Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 52, 1133–1142.
- Oh, W., Gelardi, N.L., and Cha, C.J. (1991). The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. *Pediatr. Res.* 29, 606–610.



- Ojeda, N.B., Grigore, D., Robertson, E.B., and Alexander, B.T. (2007a). Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 50, 679–685.
- Ojeda, N.B., Grigore, D., Yanes, L.L., Iliescu, R., Robertson, E.B., Zhang, H., and Alexander, B.T. (2007b). Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R758–R763.
- Ojeda, N.B., Royals, T.P., Black, J.T., Dasinger, J.H., Johnson, J.M., and Alexander, B.T. (2010). Enhanced sensitivity to acute angiotensin II is testosterone dependent in adult male growth-restricted offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1421–R1427.
- Ong, K.K., Ahmed, M.L., Emmett, P.M., Preece, M.A., and Dunger, D.B. (2000). Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ* 320, 967–971.
- O'Regan, D., Kenyon, C.J., Seckl, J.R., and Holmes, M.C. (2008). Prenatal dexamethasone “programmes” hypotension, but stress-induced hypertension in adult offspring. *J. Endocrinol.* 196, 343–352.
- O'Reilly, J.R., and Reynolds, R.M. (2013). The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 78, 9–16.
- Ortiz, L.A., Quan, A., Zarzar, F., Weinberg, A., and Baum, M. (2003). Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 41, 328–334.
- Osol, G., and Mandala, M. (2009). Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiol. Bethesda Md* 24, 58–71.
- Ozaki, T., Nishina, H., Hanson, M.A., and Poston, L. (2001). Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J. Physiol.* 530, 141–152.
- Painter, R.C., Roseboom, T.J., and Bleker, O.P. (2005). Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 20, 345–352.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.
- Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1251–1256.
- Park, J.H., Stoffers, D.A., Nicholls, R.D., and Simmons, R.A. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest.* 118, 2316–2324.
- Patil, M.A., Suryanarayana, P., Putcha, U.K., Srinivas, M., and Reddy, G.B. (2014). Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 463264.
- Perusquía, M., and Stallone, J.N. (2010). Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H1301–H1307.
- Petersen-Jones, H.G., Johnson, K.B., Hitomi, K., Tykocki, N.R., Thompson, J.M., and Watts, S.W. (2015). Transglutaminase activity is decreased in large arteries from hypertensive rats compared with normotensive controls. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, H592–H602.
- Pettitt, D.J., Knowler, W.C., Bennett, P.H., Aleck, K.A., and Baird, H.R. (1987). Obesity in offspring of diabetic Pima Indian women despite normal birth weight. *Diabetes Care* 10, 76–80.
- Pistea, A., Bakker, E.N.T.P., Spaan, J.A.E., Hardeman, M.R., van Rooijen, N., and VanBavel, E. (2008). Small artery remodeling and erythrocyte deformability in L-NAME-induced hypertension: role of transglutaminases. *J. Vasc. Res.* 45, 10–18.
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rittel, F., Rohde, W., and Dörner, G. (1998). Hypothalamic insulin and neuropeptide Y in the offspring of gestational diabetic mother rats. *Neuroreport* 9, 4069–4073.
- Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., et al. (2009). Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J. Physiol.* 587, 4963–4976.
- Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., and Bassenge, E. (1986). Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8, 37–44.
- Ponzio, B.F., Carvalho, M.H.C., Fortes, Z.B., and do Carmo Franco, M. (2012). Implications of maternal nutrient restriction in transgenerational programming of hypertension and endothelial dysfunction across F1-F3 offspring. *Life Sci.* 90, 571–577.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Porter, J.P., King, S.H., and Honeycutt, A.D. (2007). Prenatal high-salt diet in the Sprague-Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R334–R342.
- Portha, B., Fournier, A., Kioon, M.D.A., Mezger, V., and Movassat, J. (2014). Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie* 97, 1–15.
- Porto, N.P.C., Jucá, D.M., Lahlou, S., Coelho-de-Souza, A.N., Duarte, G.P., and Magalhães, P.J.C. (2010). Effects of K<sup>+</sup>channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 118, 360–363.
- Poston, L. (2011). Intergenerational transmission of insulin resistance and type 2 diabetes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 106, 315–322.
- Prewitt, R.L., Rice, D.C., and Dobrian, A.D. (2002). Adaptation of resistance arteries to increases in pressure. *Microcirc. N. Y. N* 1994 9, 295–304.
- Pries, A.R., Reglin, B., and Secomb, T.W. (2005). Remodeling of blood vessels: responses of diameter and wall thickness to hemodynamic and metabolic stimuli. *Hypertension* 46, 725–731.
- Pueyo, M.E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J.F., and Michel, J.B. (2000). Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 645–651.
- Qian, H., Luo, N., and Chi, Y. (2012). Aging-shifted prostaglandin profile in endothelium as a factor in cardiovascular disorders. *J. Aging Res.* 2012, 121390.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1987). Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.* 92, 181–187.
- Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., and Galis, Z.S. (1996). Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest.* 98, 2572–2579.
- Ramos-Alves, F.E., de Queiroz, D.B., Santos-Rocha, J., Duarte, G.P., and Xavier, F.E. (2012). Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 166, 2198–2208.
- Räsänen, J., and Kirkinen, P. (1987). Growth and function of human fetal heart in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 66, 349–353.
- Ravelli, A.C., van der Meulen, J.H., Michels, R.P., Osmond, C., Barker, D.J., Hales, C.N., and Bleker, O.P. (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet Lond. Engl.* 351, 173–177.
- Ravelli, A.C., van Der Meulen, J.H., Osmond, C., Barker, D.J., and Bleker, O.P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 811–816.
- Reckelhoff, J.F. (2001). Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 37, 1199–1208.
- Renna, N.F., de Las Heras, N., and Miatello, R.M. (2013). Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int. J. Hypertens.* 2013, 808353.
- Retailleau, K., Belin de Chantemèle, E.J., Chanoine, S., Guihot, A.-L., Vessières, E., Toutain, B., Faure, S., Bagi, Z., Loufrani, L., and Henrion, D. (2010). Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A2 reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. *Hypertension* 55, 339–344.
- Reverte, V., Tapia, A., Moreno, J.M., Rodríguez, L., Salazar, F., Llinás, M.T., and Salazar, F.J. (2011a). Renal effects of prolonged high protein intake and COX2 inhibition on hypertensive rats with altered renal development. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301, F327–F333.
- Reverte, V., Tapia, A., Moreno, J.M., Rodríguez, L., Salazar, F., Llinás, M.T., and Salazar, F.J. (2011b). Renal effects of prolonged high protein intake and COX2 inhibition on hypertensive rats with altered renal development. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301, F327–F333.
- Reynolds, W.A., Chez, R.A., Bhuyan, B.K., and Neil, G.L. (1974). Placental transfer of streptozotocin in the rhesus monkey. *Diabetes* 23, 777–782.

- Rich-Edwards, J.W., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rosner, B., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., Willett, W.C., and Hennekens, C.H. (1997). Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 315, 396–400.
- Riggs, A.D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* 14, 9–25.
- Rizzoni, D., Porteri, E., Castellano, M., Bettoni, G., Muiesan, M.L., Muiesan, P., Giulini, S.M., and Agabiti-Rosei, E. (1996). Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension* 28, 785–790.
- Rizzoni, D., Porteri, E., Boari, G.E.M., De Ciuceis, C., Sleiman, I., Muiesan, M.L., Castellano, M., Miclini, M., and Agabiti-Rosei, E. (2003). Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation* 108, 2230–2235.
- Rocha, S.O., Gomes, G.N., Forti, A.L.L., do Carmo Pinho Franco, M., Fortes, Z.B., de Fátima Cavanal, M., and Gil, F.Z. (2005). Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. *Pediatr. Res.* 58, 1274–1279.
- Rodford, J.L., Torrens, C., Siow, R.C.M., Mann, G.E., Hanson, M.A., and Clough, G.F. (2008). Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease. *J. Physiol.* 586, 4709–4720.
- Rodriguez-Iturbe, B., Zhan, C.-D., Quiroz, Y., Sindhu, R.K., and Vaziri, N.D. (2003). Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41, 341–346.
- de Rooij, S.R., Painter, R.C., Phillips, D.I.W., Osmond, C., Michels, R.P.J., Bossuyt, P.M.M., Bleker, O.P., and Roseboom, T.J. (2006). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adults who were prenatally exposed to the Dutch famine. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 155, 153–160.
- Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., et al. (2007). Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 115, e69–e171.
- Roseboom, T., de Rooij, S., and Painter, R. (2006). The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum. Dev.* 82, 485–491.
- Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Osmond, C., Barker, D.J., Ravelli, A.C., and Bleker, O.P. (2000a). Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1101–1106.
- Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Osmond, C., Barker, D.J., Ravelli, A.C., Schroeder-Tanka, J.M., van Montfrans, G.A., Michels, R.P., and Bleker, O.P. (2000b). Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart Br. Card. Soc.* 84, 595–598.
- Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Ravelli, A.C., Osmond, C., Barker, D.J., and Bleker, O.P. (2001). Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* 185, 93–98.
- Rubin, M.M. (2007). Antenatal exposure to DES: lessons learned...future concerns. *Obstet. Gynecol. Surv.* 62, 548–555.
- Saez, F., Castells, M.T., Zuasti, A., Salazar, F., Reverte, V., Loria, A., and Salazar, F.J. (2007). Sex differences in the renal changes elicited by angiotensin II blockade during the nephrogenic period. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 49, 1429–1435.
- Saito, Y., and Berk, B.C. (2001). Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 3–7.
- Sandoo, A., van Zanten, J.J.C.S.V., Metsios, G.S., Carroll, D., and Kitas, G.D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc. Med. J.* 4, 302–312.
- Santhanam, L., Taday, E.C., Webb, A.K., Dowzicky, P., Kim, J.H., Oh, Y.J., Sikka, G., Kuo, M., Halushka, M.K., Macgregor, A.M., et al. (2010). Decreased S-nitrosylation of tissue transglutaminase contributes to age-related increases in vascular stiffness. *Circ. Res.* 107, 117–125.
- Savoia, C., and Schiffrin, E.L. (2006). Inflammation in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 15, 152–158.
- Savoia, C., and Schiffrin, E.L. (2007). Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 112, 375–384.
- Schein, P.S., and Loftus, S. (1968). Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res.* 28, 1501–1506.
- Seckl, J.R., and Meaney, M.J. (2004). Glucocorticoid programming. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1032, 63–84.

**Abdallah Dib** | Programmation foetale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat

- Seckl, J.R., Cleasby, M., and Nyirenda, M.J. (2000). Glucocorticoids, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney Int.* 57, 1412–1417.
- Segar, E.M., Norris, A.W., Yao, J.-R., Hu, S., Koppenhafer, S.L., Roghair, R.D., Segar, J.L., and Scholz, T.D. (2009). Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 117, 129–138.
- Shaw, J. (2007). Epidemiology of childhood type 2 diabetes and obesity. *Pediatr. Diabetes* 8 *Suppl* 9, 7–15.
- Shi, Y., Patel, S., Niculescu, R., Chung, W., Desrochers, P., and Zalewski, A. (1999). Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the regulation of coronary cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1150–1155.
- Shimokawa, H., Flavahan, N.A., Lorenz, R.R., and Vanhoutte, P.M. (1988). Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br. J. Pharmacol.* 95, 1197–1203.
- Shumacker, H.B. (1970). Aneurysm development and degenerative changes in dilated artery proximal to arteriovenous fistula. *Surg. Gynecol. Obstet.* 130, 636–640.
- Silverman, B.L., Rizzo, T., Green, O.C., Cho, N.H., Winter, R.J., Ogata, E.S., Richards, G.E., and Metzger, B.E. (1991). Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes* 40 *Suppl* 2, 121–125.
- Silverman, B.L., Metzger, B.E., Cho, N.H., and Loeb, C.A. (1995). Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism. *Diabetes Care* 18, 611–617.
- Silverman, B.L., Rizzo, T.A., Cho, N.H., and Metzger, B.E. (1998). Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care* 21 *Suppl* 2, B142–B149.
- Simmons, R.A. (2006). Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 917–922.
- Simonetti, G.D., Schwertz, R., Klett, M., Hoffmann, G.F., Schaefer, F., and Wühl, E. (2011). Determinants of blood pressure in preschool children: the role of parental smoking. *Circulation* 123, 292–298.
- Sinclair, K.D., Allegrucci, C., Singh, R., Gardner, D.S., Sebastian, S., Bispham, J., Thurston, A., Huntley, J.F., Rees, W.D., Maloney, C.A., et al. (2007). DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19351–19356.
- Skilton, M.R. (2008). Intrauterine risk factors for precocious atherosclerosis. *Pediatrics* 121, 570–574.
- Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J. Diabetes Investig.* 5, 349–358.
- Smith, A.H., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Liaw, J., von Ehrenstein, O., Steinmaus, C., Bates, M.N., and Selvin, S. (2006). Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environ. Health Perspect.* 114, 1293–1296.
- Song, S.H., and Hardisty, C.A. (2008). Early-onset Type 2 diabetes mellitus: an increasing phenomenon of elevated cardiovascular risk. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 6, 315–322.
- Soto, E., and Bahado-Singh, R. (2013). Fetal abnormal growth associated with substance abuse. *Clin. Obstet. Gynecol.* 56, 142–153.
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C.L., and Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol. Res.* 52, 313–320.
- Stanner, S.A., Bulmer, K., Andrès, C., Lantseva, O.E., Borodina, V., Poteen, V.V., and Yudkin, J.S. (1997). Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ* 315, 1342–1348.
- Stark, M.J., Wright, I.M.R., and Clifton, V.L. (2009). Sex-specific alterations in placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity and early postnatal clinical course following antenatal betamethasone. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R510–R514.
- Stroes, E., Hijmering, M., van Zandvoort, M., Wever, R., Rabelink, T.J., and van Faassen, E.E. (1998). Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 438, 161–164.
- Su, E.J., Lombardi, D.M., Siegal, J., and Schwartz, S.M. (1998). Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension* 31, 1331–1337.

- Susser, E., Neugebauer, R., Hoek, H.W., Brown, A.S., Lin, S., Labovitz, D., and Gorman, J.M. (1996). Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch. Gen. Psychiatry* 53, 25–31.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 50, 537–546.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 237, 481–490.
- Taddei, S., Viridis, A., Mattei, P., Arzilli, F., and Salvetti, A. (1992). Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subjects with familial history of hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 12, S193–S195.
- Tam, W.H., Ma, R.C.W., Yang, X., Li, A.M., Ko, G.T.C., Kong, A.P.S., Lao, T.T.H., Chan, M.H.M., Lam, C.W.K., and Chan, J.C.N. (2010). Glucose intolerance and cardiometabolic risk in adolescents exposed to maternal gestational diabetes: a 15-year follow-up study. *Diabetes Care* 33, 1382–1384.
- Tamashiro, K.L.K., and Moran, T.H. (2010). Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol. Behav.* 100, 560–566.
- Tang, L., Carey, L.C., Bi, J., Valego, N., Sun, X., Deibel, P., Perrott, J., Figueroa, J.P., Chappell, M.C., and Rose, J.C. (2009). Gender differences in the effects of antenatal betamethasone exposure on renal function in adult sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R309–R317.
- Tang, P.C.Y., Qin, L., Zielonka, J., Zhou, J., Matte-Martone, C., Bergaya, S., van Rooijen, N., Shlomchik, W.D., Min, W., Sessa, W.C., et al. (2008). MyD88-dependent, superoxide-initiated inflammation is necessary for flow-mediated inward remodeling of conduit arteries. *J. Exp. Med.* 205, 3159–3171.
- Taylor, S.J., Whincup, P.H., Cook, D.G., Papacosta, O., and Walker, M. (1997). Size at birth and blood pressure: cross sectional study in 8-11 year old children. *BMJ* 314, 475–480.
- Tesch, G.H., and Allen, T.J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrol. Carlton Vic* 12, 261–266.
- Thiering, E., Brüske, I., Kratzsch, J., Thiery, J., Sausenthaler, S., Meisinger, C., Koletzko, S., Bauer, C.-P., Schaaf, B., von Berg, A., et al. (2011). Prenatal and postnatal tobacco smoke exposure and development of insulin resistance in 10 year old children. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 361–368.
- Tirapelli, C.R., Casolari, D.A., Yogi, A., Montezano, A.C., Tostes, R.C., Legros, E., D'Orléans-Juste, P., and de Oliveira, A.M. (2005). Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K<sup>+</sup> channels in ETB-induced relaxation. *Br. J. Pharmacol.* 146, 903–912.
- Tokar, E.J., Qu, W., and Waalkes, M.P. (2011). Arsenic, stem cells, and the developmental basis of adult cancer. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 120 Suppl 1, S192–S203.
- Torrens, C., Hanson, M.A., Gluckman, P.D., and Vickers, M.H. (2009). Maternal undernutrition leads to endothelial dysfunction in adult male rat offspring independent of postnatal diet. *Br. J. Nutr.* 101, 27–33.
- Touyz, R.M. (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp. Physiol.* 90, 449–455.
- Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem. Cell Biol.* 122, 339–352.
- Tran, S., Chen, Y.-W., Chenier, I., Chan, J.S.D., Quaggin, S., Hébert, M.-J., Ingelfinger, J.R., and Zhang, S.-L. (2008). Maternal diabetes modulates renal morphogenesis in offspring. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 943–952.
- Tronc, F., Wassef, M., Esposito, B., Henrion, D., Glagov, S., and Tedgui, A. (1996). Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 1256–1262.
- Tronc, F., Mallat, Z., Lehoux, S., Wassef, M., Esposito, B., and Tedgui, A. (2000). Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, E120–E126.
- Tuttle, J.L., Nachreiner, R.D., Bhuller, A.S., Condict, K.W., Connors, B.A., Herring, B.P., Dalsing, M.C., and Unthank, J.L. (2001). Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H1380–H1389.



- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Dejana, E., Schultz, D.A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., and Schwartz, M.A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437, 426–431.
- Van Assche, F.A., Holemans, K., and Aerts, L. (2001). Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br. Med. Bull.* 60, 173–182.
- Vanbavel, E., and Bakker, E.N.T.P. (2008). A vascular bone collector: arterial calcification requires tissue-type transglutaminase. *Circ. Res.* 102, 507–509.
- Varvarigou, A.A. (2010). Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 23, 215–224.
- Vaziri, N.D. (2008). Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H454–H465.
- Vehaskari, V.M., and Woods, L.L. (2005). Prenatal programming of hypertension: lessons from experimental models. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16, 2545–2556.
- Vessières, E., Freidja, M.L., Loufrani, L., Fassot, C., and Henrion, D. (2012). Flow (shear stress)-mediated remodeling of resistance arteries in diabetes. *Vascul. Pharmacol.* 57, 173–178.
- Vessières, E., Dib, A., Bourreau, J., Lelièvre, E., Custaud, M.-A., Lelièvre-Pégorier, M., Loufrani, L., Henrion, D., and Fassot, C. (2016). Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed In Utero to Maternal Hyperglycaemia. *PLoS One* 11, e0146830.
- Vickers, M.H. (2011). Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. *World J. Diabetes* 2, 137–148.
- Vickers, M.H., Clayton, Z.E., Yap, C., and Sloboda, D.M. (2011). Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. *Endocrinology* 152, 1378–1387.
- Vrachnis, N., Antonakopoulos, N., Iliodromiti, Z., Dafopoulos, K., Siristatidis, C., Pappa, K.I., Deligeorgiou, E., and Vitoratos, N. (2012). Impact of maternal diabetes on epigenetic modifications leading to diseases in the offspring. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 538474.
- Waddington, C.H. (1974). A catastrophe theory of evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 231, 32–42.
- Walther, F.J. (1988). Growth and development of term disproportionate small-for-gestational age infants at the age of 7 years. *Early Hum. Dev.* 18, 1–11.
- Warren, M.K., and Ralph, P. (1986). Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *J. Immunol. Baltim. Md* 137, 2281–2285.
- Waterland, R.A., and Garza, C. (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 179–197.
- Waterland, R.A., and Jirtle, R.L. (2004). Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 20, 63–68.
- Wei, M., Ong, L., Smith, M.T., Ross, F.B., Schmid, K., Hoey, A.J., Burstow, D., and Brown, L. (2003). The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung Circ.* 12, 44–50.
- Weiss, C., Passow, H., and Rothstein, A. (1959). Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am. J. Physiol.* 196, 1115–1118.
- Wenger, N.K., Speroff, L., and Packard, B. (1993). Cardiovascular health and disease in women. *N. Engl. J. Med.* 329, 247–256.
- West, N.A., Crume, T.L., Maligie, M.A., and Dabelea, D. (2011). Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia* 54, 504–507.
- Whyte, J.J., and Laughlin, M.H. (2010). The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 199, 441–450.
- Wichi, R.B., Souza, S.B., Casarini, D.E., Morris, M., Barreto-Chaves, M.L., and Irigoyen, M.C. (2005). Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R1129–R1133.

- Wilcoxon, J.S., Schwartz, J., Aird, F., and Redei, E.E. (2003). Sexually dimorphic effects of maternal alcohol intake and adrenalectomy on left ventricular hypertrophy in rat offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E31–E39.
- Woods, L.L., and Rasch, R. (1998). Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *Am. J. Physiol.* 275, R1593–R1599.
- Woods, L.L., Ingelfinger, J.R., Nyengaard, J.R., and Rasch, R. (2001). Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr. Res.* 49, 460–467.
- Woods, L.L., Ingelfinger, J.R., and Rasch, R. (2005). Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1131–R1136.
- Wright, C.S., Rifas-Shiman, S.L., Rich-Edwards, J.W., Taveras, E.M., Gillman, M.W., and Oken, E. (2009). Intrauterine exposure to gestational diabetes, child adiposity, and blood pressure. *Am. J. Hypertens.* 22, 215–220.
- Wroblewska-Seniuk, K., Wender-Ozegowska, E., and Szczapa, J. (2009). Long-term effects of diabetes during pregnancy on the offspring. *Pediatr. Diabetes* 10, 432–440.
- Wu, M.-S., Liang, J.-T., Lin, Y.-D., Wu, E.-T., Tseng, Y.-Z., and Chang, K.-C. (2008). Aminoguanidine prevents the impairment of cardiac pumping mechanics in rats with streptozotocin and nicotinamide-induced type 2 diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 154, 758–764.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415.
- Yin, D., Tao, J., Lee, D.D., Shen, J., Hara, M., Lopez, J., Kuznetsov, A., Philipson, L.H., and Chong, A.S. (2006). Recovery of islet beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice: an indirect role for the spleen. *Diabetes* 55, 3256–3263.
- Yuan, Y., Marshall, G., Ferreccio, C., Steinmaus, C., Selvin, S., Liaw, J., Bates, M.N., and Smith, A.H. (2007). Acute myocardial infarction mortality in comparison with lung and bladder cancer mortality in arsenic-exposed region II of Chile from 1950 to 2000. *Am. J. Epidemiol.* 166, 1381–1391.
- Yung, L.M., Leung, F.P., Yao, X., Chen, Z.-Y., and Huang, Y. (2006). Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 6, 1–19.
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P.M., Bautista, C.J., Deás, M., Guillén, L., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., Larrea, F., and Nathanielsz, P.W. (2005). Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* 566, 225–236.
- Zarén, B., Lindmark, G., and Bakketeig, L. (2000). Maternal smoking affects fetal growth more in the male fetus. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 14, 118–126.
- Zhang, Q., Liu, X., Gao, W., Li, P., Hou, J., Li, J., and Wong, J. (2014). Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.* 289, 5986–5996.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., and Leung, S.W.S. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129, 83–94.



# ANNEXES

## Listes Publications

1. VESSIÈRES E, **DIB A**, BOURREAU J, LELIEVRE E, CUSTAUD MA, LELIÈVRE-PÉGORIER M., LOUFRANI L, HENRION D, FASSOT C. Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed in Utero to Maternal Hyperglycaemia. ***PLoS One***, 2016 ; 11:e0146830.
2. **DIB A**, BOURREAU J, FAJLOUN Z, LOUFRANI L, HENRION D, FASOT C. Maternal diabetes impacts inwrad remodeling in male offspring. En préparation pour ***Journal of Hypertension***.

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Abdallah Dib  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le 23 / 09 / 2016

# Thèse de Doctorat

Abdallah DIB

## Programmation fœtale du système vasculaire en réponse à l'exposition *in utero* au diabète maternel chez le rat Fetal programming of vascular system in adult rats exposed *in utero* to maternal diabetes

### Résumé

L'exposition *in utero* au diabète maternel aboutit à des changements cardiovasculaires permanents en lien avec des altérations de la fonction vasculaire. En effet, alors que le rat exposé *in utero* à l'hyperglycémie maternelle modérée (DMO) développe une hypertension artérielle à 6 mois, une altération spécifique de la vasodilatation induite par la prostacycline dans l'aorte est présente dès l'âge de 3 mois.

La prostacycline jouant un rôle clé dans le contrôle du tonus vasculaire dans les artères de résistance, nous avons émis l'hypothèse que la programmation fœtale du tonus vasculaire suite à l'hyperglycémie maternelle pouvait jouer sur la régulation de la pression artérielle chez les DMO. Notre étude montre que la relaxation induite par la prostacycline est diminuée dans les artères mésentériques aussi bien à 3 mois qu'à 18 mois; de plus, une dysfonction endothéliale tardive associée à une augmentation de l'activité contractile des cellules musculaires lisses (tonus myogénique) est observée à 18 mois. Le tonus vasculaire est étroitement lié au remodelage vasculaire; aussi nous avons étudié l'effet du diabète maternel sur le remodelage vasculaire après altération chronique de la pression ou du flux. Chez les DMO âgés, l'hypertension n'induit aucun remodelage de l'aorte, ni des artères mésentériques. Chez les jeunes DMO, la réduction du flux carotidien gauche (ligature) induit un remodelage constrictif; la carotide droite subissant, quant à elle, un remodelage expansif en réponse à l'augmentation de flux. Par contre, la ligature des artères mésentériques n'entraîne aucun remodelage en réponse à la diminution de flux chez les DMO, alors que le remodelage expansif suite à l'augmentation de flux est maintenu.

Ces résultats mettent en évidence une programmation fœtale du système vasculaire en réponse au diabète maternel, qui pourrait être impliquée dans le développement de l'hypertension à plus long terme.

**Mots clés :** diabète maternel, programmation fœtale, système vasculaire

### Abstract

Cardiovascular alterations including hypertension are lifelong consequences of *in utero* exposure to maternal diabetes. One possibility was that hypertension could be caused by alterations of vascular function. Preliminary studies demonstrated that rat exposed *in utero* to moderated maternal hyperglycemia (DMO) developed hypertension around 6 months of age, associated with a specific alteration of prostacyclin-induced vasodilation in aorta.

Because prostacyclin plays a key role in the control of vascular tone in resistance arteries, we aimed to determine whether maternal hyperglycaemia could affect this parameter in offspring. We hypothesized that fetal programming of vascular tone could impact regulation of arterial pressure in DMO. We found that prostacyclin-induced relaxation was reduced in resistance arteries both at 3- and 18-month of age; endothelium-mediated relaxation was reduced in 18-month old DMO although an increase of contractile activity of smooth muscle cells (myogenic tone) was measured at the same age.

Secondly, because vascular tone is closely linked to vascular remodeling, we studied the effect of maternal diabetes on vascular remodeling after chronic alteration of pressure or flow. In old DMO, hypertension did not induce inward remodeling neither in aorta nor in mesenteric arteries. In young DMO, the reduction of left carotid flow (induced by ligation) induced an inward remodeling; the right carotid underwent an increased flow involving outward remodeling. Conversely, in mesenteric arteries, after 1 or 3 weeks of ligation, DMO did not exhibit inward remodeling in response to low-flow although outward remodeling in high-flow arteries is maintained.

These results evidenced a fetal programming of vascular system in adult rats exposed *in utero* to maternal diabetes, which may be involved in the development of hypertension.

**Key Words :** maternal diabetes, fetal programming, vascular system