



**HAL**  
open science

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

Sofiane Safi-Stibler

► **To cite this version:**

Sofiane Safi-Stibler. Mémoire métabolique et épigénétique des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles, au cours du développement et à long terme. Biologie du développement. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS357 . tel-02796829

**HAL Id: tel-02796829**

**<https://theses.hal.science/tel-02796829>**

Submitted on 5 Jun 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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

*INRA – UMR 1198 BDR – Biologie du Développement et Reproduction – Equipe MECP2*

## **Mémoire métabolique et épigénétique des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles, au cours du développement et à long terme**

Présentée par

**Sofiane SAFI-STIBLER**

Thèse de doctorat de Sciences du Vivant

Dirigée par Delphine Ralliard-Rousseau et encadrée par Anne Gabory

Présentée et soutenue publiquement le 10 Octobre 2019

Devant un jury composé de :

Mme. Peronnet Frédérique, Enseignante/Directrice de Recherche,	Présidente
Mr. Pirola Luciano, Chargé de Recherche,	Rapporteur
Mr. Magnan Christophe, Professeur,	Rapporteur
Mme. Alexandre-Gouabau Marie-Cécile, Ingénieure de Recherche,	Examinatrice
Mr. Ferreira Guillaume, Directeur de Recherche,	Examineur
Mr. Breton Christophe, Professeur,	Examineur
Mme. Ralliard-Rousseau Delphine, Chargée de Recherche,	Directrice de thèse
Mme. Gabory Anne, Chargée de Recherche,	Encadrante de thèse

Je tiens à remercier tout d'abord le Dr. Frédérique Peronnet pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir de présider le jury de cette thèse. J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au Dr. Luciano Pirola et au Pr. Christophe Magnan pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail en détail et pour la bienveillance dont ils ont fait preuve à mon égard. Je remercie le Dr. Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, le Dr. Guillaume Ferreira et le Pr. Christophe Breton d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail de thèse. Merci à tous les membres du jury d'avoir consacré de leur temps en acceptant d'assister à la soutenance de cette thèse.

Je remercie le Dr. Corinne Cotinot de l'accueil dans l'unité de recherche « Biologie du Développement et Reproduction » (BDR) de l'INRA de Jouy-en-Josas, au sein de laquelle j'ai passé plus de quatre ans.

J'adresse mes remerciements au Dr. Delphine Rousseau-Ralliard pour avoir dirigé ma thèse et pour ses conseils et remarques enrichissantes qu'elle m'a prodigué tout du long.

Je voudrais adresser un immense MERCI au Dr. Anne Gabory pour son accueil bienveillant, son encadrement, ses conseils, sa bonne humeur et ce malgré des périodes difficiles pour tous les deux. J'ai beaucoup appris avec toi, en biologie bien entendu, mais aussi dans d'autres domaines tels que la cuisine ou les relations humaines. Si tu n'avais pas été toi, je n'aurais jamais fait de Doctorat. Je te souhaite le meilleur pour ta carrière de chercheur et pour ta vie personnelle. Merci pour tout.

Cette thèse a pu aboutir grâce à l'aide précieuse de tous les membres de l'équipe MECP2 avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler et d'échanger, qu'ils soient encore présents dans l'équipe ou parti vers de nouveaux horizons. Je souhaite remercier tout particulièrement Mélanie pour son aide précieuse sur le plan technique, expérimental et humain. Sans toi tout ce travail aurait eu du mal à aboutir et les discussions que nous avons pu avoir ont souvent été propices au questionnement et toujours été enrichissantes. Je remercie Hélène Jammes pour ses conseils ainsi que ses remarques toujours constructives tout au long de ma thèse. À Aurélie, Charline, Audrey, Eli et Hélène K., merci pour la bonne ambiance d'équipe et les discussions que nous avons pu avoir, ça a participé à rendre ces trois années agréables. Enfin, merci à Christine de m'avoir transmis des connaissances et pour l'aide qu'elle m'a apporté au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Merci à toutes les personnes de l'unité BDR que j'ai pu côtoyer et qui ont fait en sorte que cette première expérience dans la vie active ait été agréable et enrichissante. Je tiens à remercier particulièrement les membres du secrétariat de l'unité, grâce auxquelles les tâches administratives ont été agréables, merci pour votre compétence et votre implication dans la vie du laboratoire. Merci à tous mes collaborateurs, avec lesquels j'ai eu la chance de travailler et échanger au cours de mon doctorat. Un merci en particulier à Etienne Thévenot, pour le temps qu'il a pu m'accorder, son aide m'a été précieuse à plus d'un titre ! Enfin, merci beaucoup à Luc pour son expertise en statistique et sa manière d'expliquer les choses.

Un grand merci à tous les étudiants, doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer au cours de ces quatre dernières années. Maxime, Jean-Philippe, Polina, Sarah, Sara et Mélanie, vous avez rendu intéressante et agréable la vie au laboratoire, mais aussi les pauses café, merci à vous !

Merci aux amis et aux connaissances qui m'ont entouré, soutenu, diverti, amusé et autres joyeusetés, au cours de ces dernières années, lorsque j'en avais besoin, mais aussi lorsque je n'en avais pas besoin ! Les moments que j'ai passé avec vous en surface ou en bas m'ont grandement aidé à garder la tête hors de l'eau, le jonglage sur les quais et les balades en carrières ont été un exutoire parfait en votre compagnie. Une pensée pour Kevin, j'aurais aimé fêter ça avec toi, tu me manques mon ami.

Je remercie ma famille, qui m'a poussé à avancer et à cru en moi depuis toujours. Sans vous je ne serai pas là où j'en suis ! Je remercie en particulier ma mère pour ses conseils et ses encouragements.

Enfin, merci à Manon, d'avoir été à mes côtés, de m'avoir supporté et soutenu au cours du doctorat et d'avoir été là lorsque j'en avais le plus besoin.



# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : OBESITE ET PERTE DE POIDS.....</b>	<b>4</b>
<b>1) Epidémie d'obésité.....</b>	<b>4</b>
1.1) Définition.....	4
1.2) Prévalence de l'obésité.....	5
1.2.1) Dans le monde.....	5
1.2.2) En France.....	6
1.3) Risques associés.....	7
1.4) Etiologie de l'obésité.....	7
1.4.1) Causes de l'obésité.....	7
1.4.2) Physiopathologie de l'obésité.....	8
2) Obésité maternelle dans le contexte de la DOHaD    2.1) Définition de la DOHaD.....	10
2.2) Preuves du conditionnement développemental induit par l'obésité maternelle chez l'humain.....	11
2.2.1) Prévalence de l'obésité chez les femmes en âge de procréer.....	11
2.2.2) Complications associées à l'obésité.....	12
2.2.3) Conditionnement du phénotype de la descendance par l'obésité maternelle.....	12
2.3) Modèles animaux d'obésité maternelle.....	15
2.3.1) Modèles animaux et modalités de prise de poids.....	15
2.3.2) Fenêtres critiques de l'influence de l'obésité maternelle sur la descendance.....	16
2.3.3) Effets respectifs du régime hyperlipidique et de l'obésité maternelle sur le phénotype de la descendance.....	18
2.4) Mécanismes du conditionnement développemental par l'obésité maternelle.....	20
2.4.1) Altération des systèmes biologiques de la descendance par l'obésité maternelle.....	20
2.4.2) Mécanismes épigénétiques et obésité dans le concept de la DOHaD.....	22
<b>3) Perte de poids préconceptionnelle et effets sur la santé de la descendance.....</b>	<b>26</b>
3.1) Recommandations préconceptionnelles.....	26
3.2) Effets de la perte de poids préconceptionnelle maternelle sur la santé de la descendance.....	27
3.2.1) Chirurgie bariatrique.....	28
3.2.2) Exercice physique.....	29
3.3.3) Intervention nutritionnelle.....	31
<b>CHAPITRE II : FONCTIONS HEPATIQUES ET IMPACT DES TRAJECTOIRES PONDERALES MATERNELLES PRECONCEPTIONNELLES.....</b>	<b>35</b>
<b>1) Morphologie, organisation et rôle central du foie à l'âge adulte.....</b>	<b>35</b>
1.1) Morphologie et organisation fonctionnelle à l'âge adulte.....	35
1.2) Rôle central du foie pendant la vie adulte.....	36
1.2.1) Métabolisme glucidique.....	37
1.2.2) Métabolisme lipidique.....	39
1.2.3) Métabolisme protéique.....	40
1.2.4) Contrôles du métabolisme énergétique.....	41
1.3) Physiopathologie hépatique en contexte d'obésité.....	42
1.3.1) Stéatose hépatique non alcoolique.....	42
1.3.2) Etiologie de la stéatose hépatique.....	42
1.3.3) Mécanismes épigénétiques impliqués dans la stéatose hépatique.....	43

<b>2) Développement et fonctions hépatiques in utero .....</b>	<b>45</b>
2.1) Développement <i>in utero</i> .....	46
2.1.1) Développement et morphogenèse hépatique.....	46
2.1.2) Régulation du développement hépatique .....	47
2.2) Fonctions hépatiques au cours du développement fœtal.....	49
2.2.1) Fonction hématopoïétique chez le fœtus .....	49
2.2.2) Métabolisme et fonctions hépatiques chez le fœtus et en période post-natale .....	49
<b>3) Programmation et conditionnement développemental dans le foie par la physiologie maternelle.....</b>	<b>53</b>
3.1) Effets de la nutrition maternelle sur le phénotype hépatique des descendants adultes.....	53
3.1.1) <i>Western diet</i> (WSD, dit régime occidental).....	53
3.1.2) Perturbations hépatiques par la nutrition hyperlipidique maternelle (HFD).....	54
3.2) Mécanismes de programmation développementale du métabolisme hépatique.....	57
3.2.1) Altération des voies de signalisation et acteurs moléculaires .....	57
3.2.2) Mécanismes épigénétiques de programmation hépatique précoce .....	62
3.2.3) Mécanismes : conclusions.....	63
<b>CHAPITRE III : TRAJECTOIRES PONDERALES MATERNELLES ET LEUR IMPACT CEREBRAL .....</b>	<b>65</b>
<b>1) Cerveau et métabolisme .....</b>	<b>65</b>
1.1) Morphologie et organisation fonctionnelle cérébrale à l'âge adulte.....	65
1.2) Hypothalamus et métabolisme .....	67
1.2.1) Morphologie et organisation fonctionnelle de l'hypothalamus .....	67
1.2.3) Hypothalamus et contrôle de la balance énergétique.....	68
1.3) Bulbe olfactif.....	70
1.3.1) Morphologie et organisation fonctionnelle du bulbe olfactif.....	70
1.3.2) Bulbe olfactif et contrôle de la prise alimentaire.....	71
<b>2) Développement cérébral <i>in-utero</i> .....</b>	<b>75</b>
2.1) Phases du développement précoce du SNC .....	75
2.2) Phases de développement de l'hypothalamus.....	76
2.3) Phases de développement du bulbe olfactif .....	77
<b>3) Effet de l'environnement maternel nutritionnel sur le développement fœtal .....</b>	<b>79</b>
3.1) Effets de la physiologie maternelle sur le développement cérébral.....	79
3.2) Effets hypothalamiques.....	81
3.2.1) Effets de la physiologie maternelle sur l'hypothalamus .....	81
3.2.2) Impact de la nutrition hyperlipidique maternelle sur l'hypothalamus .....	82
3.3) Effet de l'environnement maternel sur le développement de la sphère olfactive .....	84
3.3.1) Cas particulier des composants odorants .....	84
3.3.2) Effet du contexte métabolique maternel sur le système olfactif.....	85
<b>4) Mécanismes de programmation par la nutrition maternelle hyperlipidique dans le système nerveux central... 86</b>	<b>86</b>
4.1) Mécanismes impliqués dans la programmation développementale hypothalamique des descendants par la nutrition maternelle hyperlipidique .....	87
4.2) Mécanismes impliqués dans la programmation développementale du bulbe olfactif par la nutrition maternelle hyperlipidique .....	89

OBJECTIFS DE LA THESE.....	92
RESULTATS .....	95
<b>1) Modèle Trajectoires Pondérales Maternelles Préconceptionnelles (TPMP).....</b>	<b>95</b>
1.1) Rappel du protocole expérimental et des résultats antérieurs.....	95
1.2) Analyses complémentaires.....	97
Ma contribution dans cette étude a été de réaliser les mesures de leptinémie ainsi que l'intégration des données phénotypiques à l'aide d'analyses factorielles multiples. ....	97
1.2.1) Dosage de la leptine sérique .....	97
1.2.2) Analyse factorielle multiple (AFM).....	97
1.3) Article «Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice» .....	99
<b>2) Effet des trajectoires pondérales maternelles sur le profil métabolique du foie et du cerveau, révélé par une approche métabolomique non-dirigée, chez la souris.....</b>	<b>100</b>
<i>Effect of maternal ponderal trajectories on metabolic profiles in liver and brain revealed by non-targeted metabolomics approach in mice.....</i>	<b>100</b>
2.1) Contexte .....	100
2.2) Méthodes .....	103
2.2.1) Analyses statistiques .....	103
2.2.2) Analyses bio-informatiques.....	104
2.2.3) Protocole d'analyse des données issues d'étude métabolomique .....	105
2.3) Résultats et conclusions .....	106
2.4) Article .....	109
3) Décryptage des acteurs épigénétiques du conditionnement	
3.1) Contexte.....	110
3.2) Sélection de la marque d'histone, pour l'analyse épigénétique .....	111
3.2.1) Optimisation du protocole de western blot.....	112
3.2.2) Résultats des western blots .....	114
DISCUSSION.....	116
<b>1) Phénotype et métabolisme.....</b>	<b>116</b>
1.1) Originalités et limites.....	116
1.1.1) Modèle expérimental.....	116
1.1.2) Approche utilisée .....	118
1.2) Effet majeur du régime post-sevrage .....	120
1.2.1) Le foie est très sensible au régime HFD, révélant sa plasticité métabolique.....	121
1.2.2) Le régime HFD altère le métabolisme des acides aminés dans l'hypothalamus.....	123
1.2.3) Le bulbe olfactif est peu sensible au régime HFD post-sevrage.....	124
1.3) Métabolites communs.....	126
1.3.1) Le régime HFD entraîne une diminution de l'abondance en anhydroglucitol dans les trois tissus	126
1.3.2) Le régime HFD entraîne une diminution de l'abondance en saccharopine dans les trois tissus .....	127
1.3.3) Le régime HFD entraîne une augmentation de l'abondance en $\beta$ -hydroxybutyrate dans les trois tissus.....	128
1.4) Effets du groupe maternel.....	131
1.4.1) Interaction avec le régime post-sevrage sur un pentose- ou hexose-phosphate (P/H-P).....	131
1.4.2) Programmation de l'abondance en ansérine par l'obésité maternelle .....	131
1.5) Perspectives.....	133

<b>2) Epigénétique et métabolisme .....</b>	<b>135</b>
2.1) Originalités et limites.....	135
2.2) Approche utilisée : western blot .....	135
2.3) Approches alternatives au western blot.....	136
2.4) Perspectives.....	136

<b>3) Conclusions générales .....</b>	<b>138</b>
---------------------------------------	------------

<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>140</b>
---------------------------	------------

<b>ANNEXES .....</b>	<b>165</b>
----------------------	------------

Protocole I. Analyses de données brutes de métabolomique	
Protocole II. Analyses des données de métabolomiques annotées par Profilomic	
Tableau I. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles réalisées dans le foie	
Tableau II. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles de l'hypothalamus	
Tableau III. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles du bulbe olfactif	
Tableau IV. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans le foie	
Tableau V. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans l'hypothalamus	
Tableau VI. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans le bulbe olfactif	
Tableau VII. Détail de la sélection des foetus du modèle TPMP pour les analyses de western blot	
Protocole III. Extraction des histones de foies fœtaux de souris	
Protocole IV. Western blot utilisant le système de transfert semi-sec	
Protocole V. Protocole V. CHIP-seq, basé sur le protocole utilisé au département des Sciences Animales de l'Université de Davis	

# Liste des abréviations

AA	Acides aminés
Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN	Acides désoxyribonucléiques
AG	Acides gras
AgRP	Agouti-related protein
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	<i>AMP activated protein kinase</i>
APO	Aire préoptique
ARN	Acides ribonucléiques
ATP	Adénosine triphosphate
BCAA	Acide aminé ramifié
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CART	Neuropeptide transcrit et réégué par la cocaïne et l'amphétamine
ChREBP	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
CM	Corps mamillaire
CSH	Cellule souche hématopoïétique
DNMT	ADN-méthyltransférase
DOHaD	Origines développementales de la santé et des maladies
EM	Eminence médiane
F6P	Fructose-6-phosphate
FASN	<i>Fatty acid synthase</i>
FBPase	Fructose bisphosphatase
FOXO1	<i>Forkhead box O1</i>
G6P	Glucose-6-phosphate
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GCK	Glucokinase
GP	Glycogène phosphorylase
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
GYS	Glycogène synthase
HAS	Haute Autorité de Santé
HDAC	Histones-désacétylases
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HFD	Régime hyperlipidique
HFS	Régime hyperlipidique et hyperglucidique
Hsd11 $\beta$ 1	11 $\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase 1
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IMC	Indice de masse corporelle
Irs1	<i>Insuline receptor substrate 1</i>
KAT	Lysines-acétyltransférase
KDM	Lysines-déméthylase
KMT	Lysines-méthyltransférase
LCS	Liquide cérébro-spinal
L-PK	<i>Liver pyruvate kinase</i>

MC3-R	Récepteur 3 à la mélanocortine
MC4-R	Récepteur 4 à la mélanocortine
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NA	Noyau arqué
NADPH	Nicotamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD	Stéatose hépatique non-alcoolique
NASH	Stéatohépatite non alcoolique
NDM	Noyau dorsomédian
NHA	Noyau hypothalamique antérieur
NHL	Noyau hypothalamique latéral
NHP	Noyau hypothalamique prémamillaire
NPO	Noyau préoptique
NPV	Noyau paraventriculaire
NPY	Neuropeptide Y
NSC	Noyau supra-chiasmatique
NSO	Noyau supraoptique
NVM	Noyau ventromédial
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK	Phosphofructo-1 kinase
PGC-1 $\alpha$	<i>PPAR gamma coactivator-1<math>\alpha</math></i>
POMC	Pro-opiomélanocortine
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyisome
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SAM	S-adénosine-méthionine
SIRT	Sirtuine
SNC	Système nerveux central
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
TAB	Tissu adipeux blanc
TCA	Acide tricarboxylique
TG	Triglycérides
Tph1	Tryptophane hydroxylase 1
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
WSD	Régime occidental
$\alpha$ -MSH	Hormone alpha-stimulante de la mélanocortine

# Index des figures et des tableaux

## Introduction

Figure 1. Prévalence de l'obésité ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) dans le monde, chez les femmes (A) et les hommes (B) âgé(e)s de plus de 18 ans en 2016	5
Figure 2. Prévalence de l'obésité ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) dans le monde chez les filles (A) et les garçons (B) âgé(e)s de 6 à 17 ans en 2015	6
Figure 3. Comorbidités associées à l'obésité	7
Figure 4. Facteurs influençant le développement de l'obésité et leurs interactions	7
Figure 5. Voies par lesquelles l'obésité mène à des comorbidités	9
Figure 6. Effets de la nutrition hyperlipidique et/ou de l'obésité maternelle sur les systèmes biologiques de la descendance	21
Figure 7. Régulation de la transcription génique par les marques épigénétiques	22
Figure 8. "Writers", "Readers" et "Erasers" des marques épigénétiques	22
Figure 9. Métabolisme à un carbone (1C) et méthylation	23
Figure 10. Métabolisme de l'acétate	23
Figure 11. Mécanismes de transduction des signaux de l'environnement cellulaire	24
Figure 12. Relations entre le métabolisme et la machinerie épigénétique	25
Figure 13. Phases de reprogrammation de l'épigénome au cours du développement	26
Figure 14. Circulation sanguine hépatique	35
Figure 15. Organisation du lobule hépatique	36
Figure 16. Représentation schématique de la voie du métabolisme du glucose	37
Figure 17. Régulation du métabolisme glucidique et lipidique par le glucagon	38
Figure 18. Voies de la lipogenèse	39
Figure 19. Régulation du métabolisme glucidique et lipidique par l'insuline	42
Figure 20. Etapes aboutissant à la formation du bourgeon hépatique	46
Figure 21. Maturation hépatique et biliaire chez la souris et l'humain	47
Figure 22. Etapes aboutissant à l'établissement définitif des CSH au cours du développement embryonnaire	49
Figure 23. Facteurs précoces de programmation de la NAFLD	53
Figure 24. Schéma simplifié des effets de la programmation hépatique de la descendance exposée au régime WSD maternel chez le primate non-humain	54
Figure 25. Mécanismes potentiels sous-tendant la programmation du développement de la NAFLD.	59
Figure 26. Représentation des douze paires de nerfs crâniens émergents de l'encéphale ainsi que leurs fonctions respectives	65
Figure 27. Représentation schématique de l'encéphale (A), d'une unité neurovasculaire (B) et de la barrière hématoencéphalique (C).	66
Figure 28. Représentation schématique des noyaux hypothalamiques en coupe frontale (A) et sagittale (B)	67
Figure 29. Système de régulation de la prise alimentaire par les neurones oréxigéniques (NPY/AgRP) et anoréxigénique (POMC).	69
Figure 30. Effets de la leptine et de l'insuline dans le NA	69
Figure 31. Contrôle de l'homéostasie énergétique par les signaux périphériques	70
Figure 32. Vue en coupe latérale du système olfactif et de l'hypothalamus	70
Figure 33. Modèle simplifié du réseau neuronal du bulbe olfactif	71
Figure 34. Régionalisation des populations de neurones sensoriels olfactifs dans l'épithélium olfactif et position correspondante des glomérules dans le bulbe olfactif	71

Figure 35. Voies de transduction des signaux olfactifs de la périphérie au SNC	72
Figure 36. Projections centrifuges du SNC sur le bulbe olfactif	72
Figure 37. Comparaison du développement neuronal hypothalamique chez l'humain et les rongeurs.	76
Figure 38. Représentation schématique de la neurogenèse embryonnaire et adulte du bulbe olfactif chez la souris	79
Figure 39. Points d'impact des expériences précoces du développement des préférences alimentaires	79
Figure 40. Contrôle de la prise alimentaire par les neurones AgRP	82
Figure 41. Rôle de l'obésité et du régime maternel dans l'augmentation du risque de troubles neuro-psychiatriques chez la descendance	84
Figure 42. Mécanismes par lesquels l'obésité maternelle peut induire une morbidité neurodéveloppementale et psychiatrique chez la descendance	86
Figure 43. Modèle animal expérimental de trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles	95
Figure 44. Expression différentielle de gènes de la machinerie épigénétique en fonction du groupe maternel dans le foie fœtal à E18.5.	96
Figure 45. Comparaison des méthodes d'extraction et de purification des histones	112
Figure 46. Comparaison de l'efficacité de transfert entre le système humide (A) et semi-sec (B).	112
Figure 47. Séquences des histones H3 et H4 de la souris	113
Figure 48. Comparaison de l'efficacité des méthodes de décapage des membranes de western blot	113
Figure 49. Vérification de l'intégrité des extraits d'histone des foies fœtaux du modèle TPMP	114
Figure 50. Exemple illustratif de western blots dirigés contre les marques H4K5ac (A), H4K12ac (B), H4 Total (C), H3K27ac (D) et H3 Total (E) sur les échantillons de foies fœtaux du modèle TPMP	115

## Discussion

Figure 51. Résumé graphique de l'étude métabolomique du projet TPMP	120
Figure 52. Résumé graphique des analyses des voies métaboliques impactées par le régime HFD post-sevrage dans le foie	123
Figure 53. Résumé graphique des analyses des voies métaboliques impactées par le régime HFD post-sevrage dans l'hypothalamus	124
Figure 54. Résumé graphique des analyses des voies métaboliques impactées par le régime HFD post-sevrage dans le bulbe olfactif	126
Figure 55. Impact du régime HFD post-sevrage sur l'anhydroglucitol	127
Figure 56. Impact du régime HFD post-sevrage sur la saccharopine	128
Figure 57. Impact du régime HFD post-sevrage sur le $\beta$ -hydroxybutyrate	131
Figure 58. Réflexion sur les réactions métaboliques pouvant entraîner une diminution de l'ansérine	132
Figure 59. Modèle animal d'étude du rôle de l'ansérine dans l'aggravation de l'obésité des descendants de mères OB	134

## Tableaux

Tableau 1. Fenêtres critiques d'influence de l'obésité et du régime maternel sur la descendance	17
Tableau 2. Prise de poids recommandée au cours de la grossesse, en fonction de l'IMC préconceptionnel	27
Tableau 3. Développement hépatique chez la souris et l'humain	46
Tableau 4. Effets de la physiologie maternelle et de l'environnement post-natal sur l'hypothalamus	81



Tableau 5. Enzymes de la machinerie épigénétique différenciellement exprimées dans le foie fœtal et modifications post-traductionnelles des histones H3 et H4 qui y sont associées	111
Tableau 6. Liste des anticorps testés et de leur condition d'utilisation	114
Tableau 7. Mise à jour des enzymes de la machinerie épigénétique différenciellement exprimées dans le foie fœtal et des modifications post-traductionnelles des histones H3 et H4 qui y sont associées	136

## **Annexes**

Protocole I. Analyses de données brutes de métabolomique

Protocole II. Analyses des données de métabolomiques annotées par Profilomic

Tableau I. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles réalisées dans le foie

Tableau II. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles de l'hypothalamus

Tableau III. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles du bulbe olfactif

Tableau IV. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans le foie

Tableau V. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans l'hypothalamus

Tableau VI. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans le bulbe olfactif

Tableau VII. Détail de la sélection des fœtus du modèle TPMP pour les analyses de western blot

Protocole III. Extraction des histones de foies fœtaux de souris du projet TPMP

Protocole IV. Western blot utilisant le système de transfert semi-sec

Protocole V. Protocole V. ChIP-seq, basé sur le protocole utilisé au département des Sciences Animales de l'Université de Davis

# **INTRODUCTION**

## Préambule

Ces 30 dernières années, nos connaissances concernant les maladies chroniques ont évolué grâce au concept des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD). Les travaux du Dr. Barker ont apporté un éclairage nouveau concernant les maladies dites « non-transmissibles » telles que l'obésité, le diabète de type 2 et les pathologies cardiovasculaires. Les travaux réalisés depuis, sur des modèles animaux et des cohortes humaines, ont permis de mettre en évidence qu'une transmission à la descendance de prédispositions à de telles maladies est possible. Il est aujourd'hui admis que l'environnement précoce peut conditionner le phénotype d'un individu à long terme. L'épigénétique émerge en tant qu'un des mécanismes sous-jacents de ce phénomène, en permettant la « mémorisation » des effets de l'environnement précoce. Les études portant sur le rôle des processus et leur lien avec l'alimentation, dans la cadre de la DOHaD, ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de l'explosion de l'obésité dans le monde au cours des dernières décennies.

L'unité de Biologie du développement et de la Reproduction (BDR) et plus particulièrement l'équipe MECP2, dans lequel j'ai réalisé mes travaux, s'intéresse aux liens entre l'épigénétique et l'environnement dans le contexte de la DOHaD. Ce travail de thèse vise à explorer les effets des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles sur le phénotype de la descendance, à court et à long terme. Afin de savoir si l'obésité et la perte de poids maternelle préconceptionnelle peuvent avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur la santé de la descendance, un modèle murin original a été développé par le Dr Anne Gabory, en utilisant une approche nutritionnelle. Les descendants de mères obèses, ou amaigries par un régime à faible apport calorique, ont été placés sous régime contrôle ou riche en énergie. Les travaux de cette thèse révèlent l'impact majeur du régime post-sevrage sur le phénotype métabolique du foie, de l'hypothalamus et du bulbe olfactif, à l'âge adulte. De plus, ces travaux ont mis en évidence un effet de programmation du phénotype métabolique de la descendance par l'obésité maternelle. Des altérations épigénétiques liées à l'alimentation pourraient avoir un impact sur l'expression de gènes liés au métabolisme énergétique dans ces organes, et par conséquent, sur la mise en place du phénotype métabolique. Ce dernier a été étudié par une approche métabolomique non dirigée. Cette méthodologie nous a permis d'obtenir une image globale des métabolites de nos trois tissus d'intérêt ainsi que d'identifier ceux ayant pu être affectés par les trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles et/ou par le régime propre des descendants de notre modèle.

Afin de mieux appréhender les travaux de cette thèse, j'aborderai dans l'introduction un premier chapitre traitant des effets de l'obésité et de la perte de poids maternelle sur la descendance à court et long terme. Dans un second chapitre, je détaillerai l'implication du foie dans le contrôle de l'homéostasie énergétique ainsi que les effets de l'obésité sur le phénotype métabolique hépatique et les mécanismes qui y sont associés, dans le contexte de la DOHaD. Enfin, je vais terminer cette introduction par un chapitre consacré à l'implication de l'hypothalamus et du bulbe olfactif dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et des comportements liés à l'alimentation. Dans ce chapitre, j'explorerai les travaux montrant l'impact de l'obésité, ainsi que les mécanismes sous-jacents, sur ces deux structures cérébrales, dans le contexte de la DOHaD.

# Chapitre I : Obésité et perte de poids

## 1) Epidémie d'obésité

### 1.1) Définition

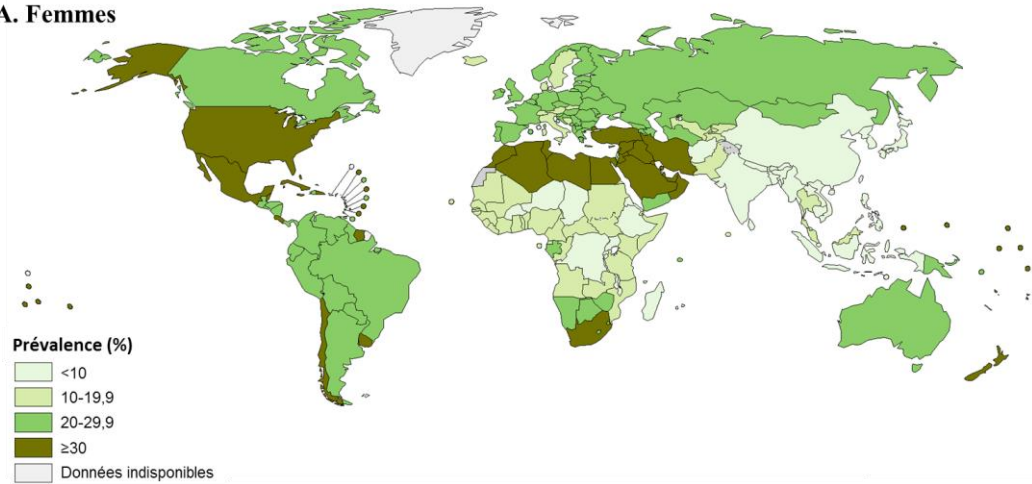
Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), l'obésité se définit comme « une accumulation anormale ou excessive de masse grasse qui présente un risque pour la santé ». L'obésité est un problème de santé publique au niveau mondial, qualifié d'épidémie par l'OMS depuis 1997. Depuis 2008, l'obésité est qualifiée de maladie par de nombreuses associations et organisations (Upadhyay et al. 2018).

Un outil d'évaluation du degré d'obésité est l'indice de masse corporelle (IMC), calculé par le ratio entre le poids et le carré de la taille et exprimé en  $\text{kg/m}^2$ . L'OMS a classé les valeurs d'IMC en différentes corpulences. En dessous de  $18,5 \text{ kg/m}^2$ , le sujet est considéré maigre ou en insuffisance pondérale. Entre  $18,5$  et  $24,9 \text{ kg/m}^2$ , la corpulence est considérée comme normale. Entre  $25$  et  $29,9 \text{ kg/m}^2$ , le sujet est en surpoids et l'obésité est atteinte pour un IMC supérieur ou égal à  $30 \text{ kg/m}^2$ . Cet outil permet également d'attribuer des degrés de sévérité à l'obésité : obésité modérée ( $30 \leq \text{IMC} < 34,9 \text{ kg/m}^2$ ), obésité sévère ( $35 \leq \text{IMC} < 39,9 \text{ kg/m}^2$ ) et obésité morbide ( $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ). Il est toutefois important de noter que l'IMC est une indication approximative ne permettant pas de rendre compte du degré d'adiposité de chaque individu (OMS 2018).

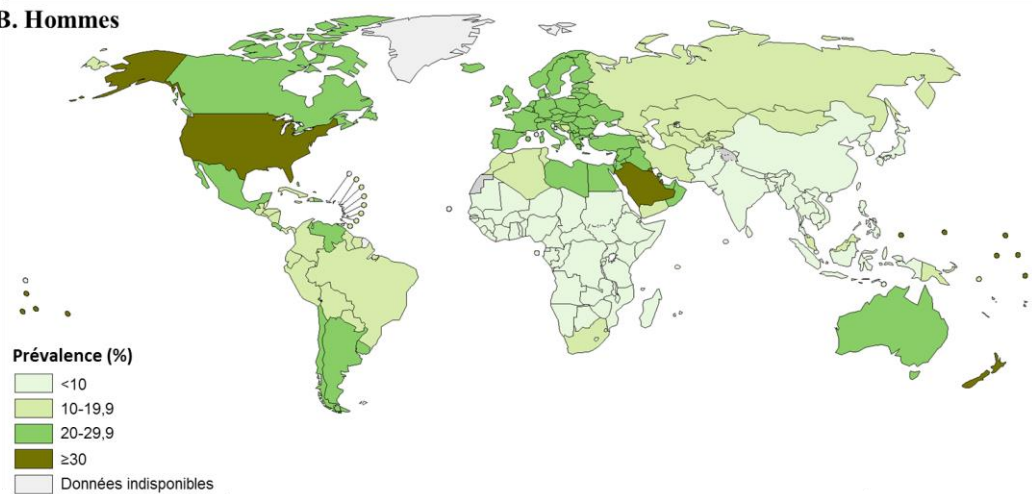
Le syndrome métabolique est souvent associé à l'obésité. Son diagnostic clinique est basé sur la présence d'une obésité dite centrale ou abdominale (circonférence abdominale  $\geq 102$  cm chez les hommes et  $\geq 89$  cm chez les femmes) associée à au moins deux des trois critères suivants (International Diabetes Federation 2007; O'Neill et O'Driscoll 2015) :

- Dyslipidémie : triglycérides (TG)  $\geq 150 \text{ mg/dl}$  et **HDL**-cholestérol (lipoprotéine de haute densité pour *high density lipoprotein*)  $< 40 \text{ mg/dl}$  pour les hommes et  $< 50 \text{ mg/dl}$  pour les femmes ;
- Pression sanguine élevée (pression systolique  $\geq 130$  ou diastolique  $\geq 85 \text{ mmHg}$ ) ;
- Glycémie à jeun élevée ( $\geq 5,6 \text{ mmol/L}$ ) ou diabète de type 2.

### A. Femmes



### B. Hommes



**Figure 1. Prévalence de l'obésité (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) dans le monde, chez les femmes (A) et les hommes (B) âgé(e)s de plus de 18 ans en 2016**

Prévalence moyenne chez les femmes : 15,8%. Prévalence moyenne chez les hommes : 11,45%

IMC – indice de masse corporelle

Adapté de World Health Organization, 2017

Il existe un dimorphisme sexuel pour bon nombre de critères morphologiques et pathologiques et la répartition de la masse grasse ne fait pas exception à cette observation. On parle d'obésité **gynoïde** quand l'excès de graisse ou tissus adipeux blanc (**TAB**) se situe principalement au niveau des cuisses, comme c'est habituellement le cas chez la femme. On parle d'obésité **androïde** quand les dépôts de graisses sont principalement au niveau du ventre, comme c'est habituellement le cas chez l'homme (équivalent de l'obésité abdominale). (Bloor et Symonds 2014).

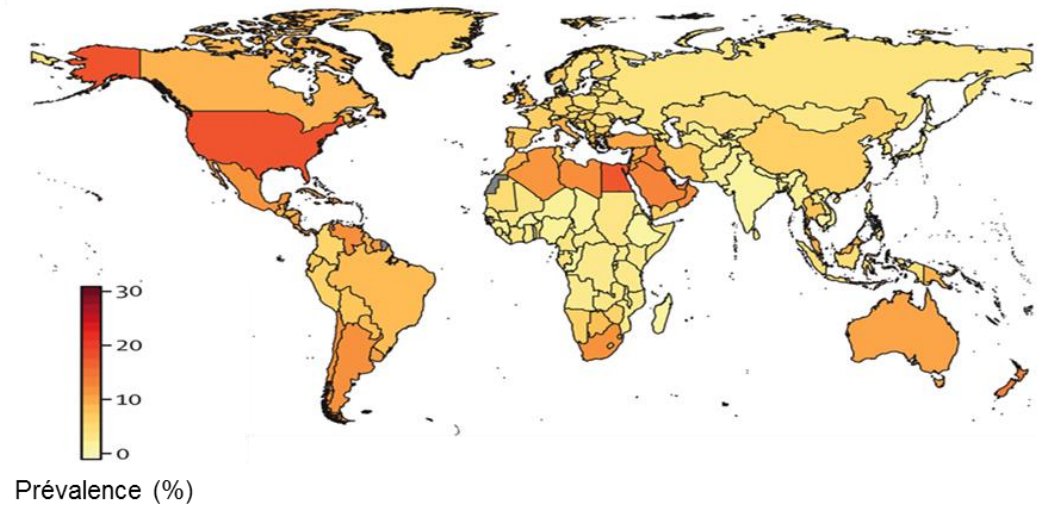
## **1.2) Prévalence de l'obésité**

### **1.2.1) Dans le monde**

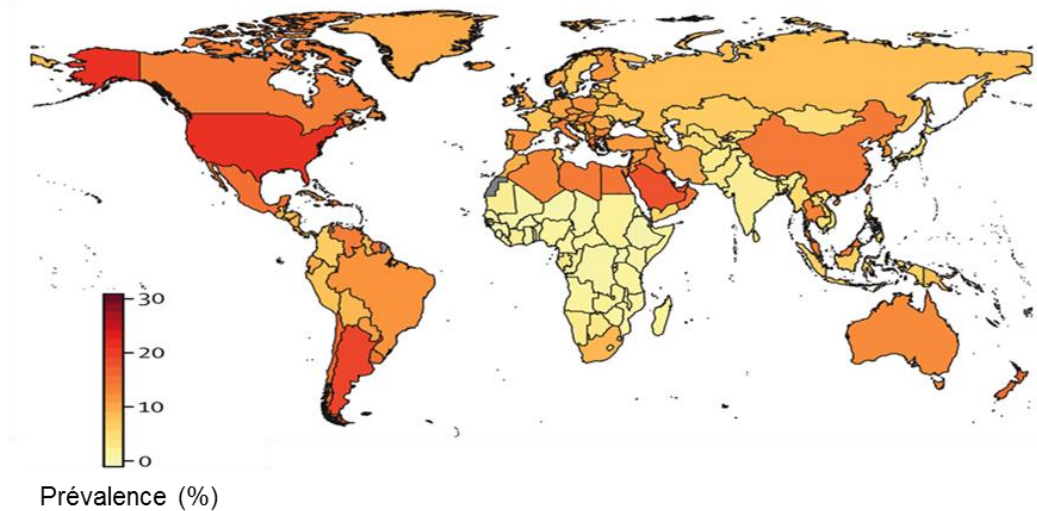
Historiquement, l'obésité était une maladie rare, présente chez les personnes en position de pouvoir, plutôt inactives physiquement et trop bien nourries, mais cette tendance s'est inversée et l'obésité a aujourd'hui une prévalence plus élevée dans les classes socio-économiques basses et moins éduquées (Upadhyay et al. 2018). Une collaboration internationale, le **NCD Risk Factor Collaboration** (Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration ou **NCD-RisC** pour Collaboration facteur de risque de maladies non communicables) a mis en évidence une augmentation globale de la prévalence de l'obésité entre 1975 et 2016. Le nombre de personnes avec un  $IMC \geq 30$  kg/m<sup>2</sup> est passé de 111 à 795 millions (hommes et femmes, de tous âges confondus) (**NCD-RisC 2017**). Sur l'ensemble de la population mondiale adulte (18 ans et plus) en 2016, la prévalence de l'obésité est de 15,8% chez les femmes et de 11,45% chez les hommes (**Figure 1**) (**NCD-RisC 2017**; United Nations 2017). Il existe de larges différences régionales de prévalence de l'obésité. Les zones géographiques présentant une prévalence  $\geq 25\%$  comprennent les pays de l'Ouest à haut revenu, l'Europe de l'Est et Centrale, l'Asie centrale, le Moyen Orient, l'Afrique du Nord, l'Amérique Latine, les Caraïbes, et l'Océanie. Les zones présentant une prévalence de l'obésité  $< 10\%$  regroupent l'Asie de l'Est, du Sud et du Sud-Est, les pays d'Asie-Pacifique à haut revenu et l'Afrique Sub-Saharienne (**NCD-RisC 2017**). Cet accroissement global de la prévalence de l'obésité est aussi mis en évidence dans une étude de 2014, qui montre que l'obésité a atteint un statut permettant de la qualifier de pandémie, avec une progression croissante au niveau mondial (Ng et al. 2014).

Chez les enfants (5 à 19 ans), cet accroissement est particulièrement inquiétant. Nous sommes passés de 0,75% de filles et 0,87% de garçons obèses en 1975 à 5,56% et 7,69%,

### A. Filles



### B. Garçons



**Figure 2. Prévalence de l'obésité ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) dans le monde chez les filles (A) et les garçons (B) âgé(e)s de 6 à 17 ans en 2015**

Prévalence moyenne chez les filles : 3,8%. Prévalence moyenne chez les garçons : 4,1%  
IMC – indice de masse corporelle

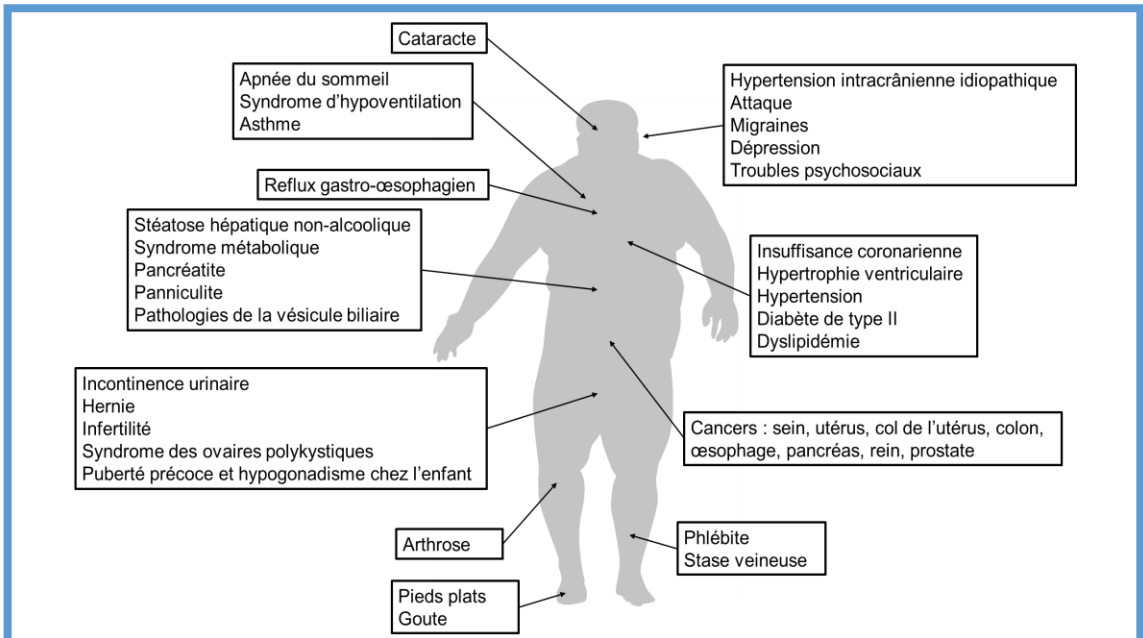
Adapté de NCD-RisC, 2017



respectivement, en 2016. Selon cette analyse la prévalence de l'obésité des moins de 20 ans augmente dans le monde avec une accélération pour les pays à faibles revenus (jusqu'à 4x par décade) et une augmentation plus modérée (30-50% par décade) pour les pays à hauts revenus. Concernant les enfants de moins de 5 ans, le rapport de l'OMS de 2016 estime leur nombre à environ 41 millions (surpoids et obésité confondus) (**Figure 2**) (OMS 2018).

### **1.2.2) En France**

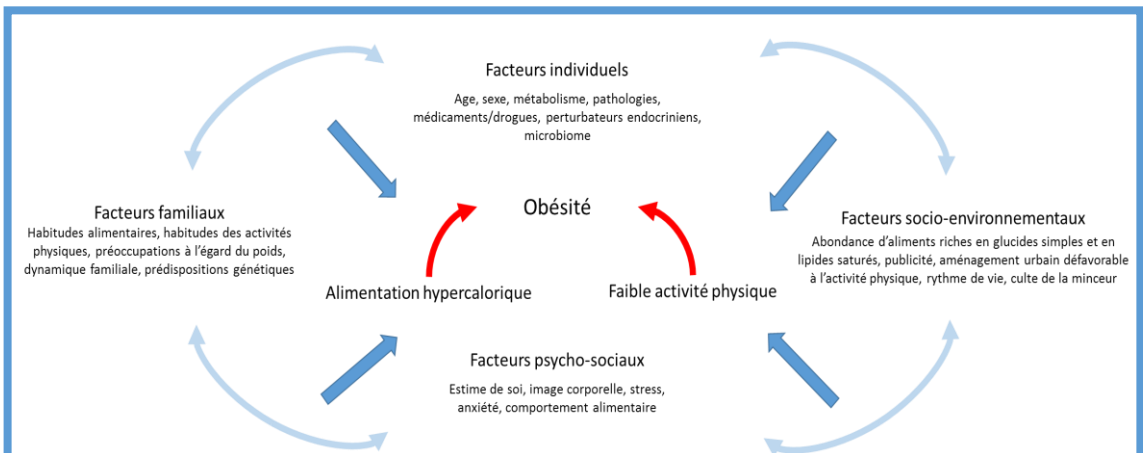
L'étude **ObEpi-Roche** (1997-2012) et les études nationales transversales **ENNS** (2006-2007) et **Esteban** (2014-2016) (Verdot 2017), ont permis un suivi de la prévalence de l'obésité en France sur une large période. Femmes et hommes confondus, 49% de la population française était en surpoids (32%) ou obèse (17%) en 2015 (Verdot 2017). Entre 1997 et 2015, l'IMC moyen en France a évolué de 24,3 à 25,8 kg/m<sup>2</sup> et le nombre de personnes obèses de 8,5% à 17,2% (ObEpi 2012; Verdot 2017). En 2015, la prévalence de l'obésité était identique chez les femmes (17,4%) et chez les hommes (16,8%). L'obésité féminine était plus élevée avant 55 ans : 11,3% de femmes contre 10,1% d'hommes de 18-39 ans et 19,7% de femmes contre 18,2% d'hommes de 40-54 ans. Passé 55 ans, cette tendance s'inverse : 20,6% de femmes contre 21,5% d'hommes âgés de 55 à 74 ans. La prévalence de l'obésité chez les enfants (6 à 17 ans) était identique chez les filles (3,8%) et les garçons (4,1%) en 2015. Les données des études **ENNS** et **Esteban** mettent néanmoins en lumière une stabilisation de la prévalence de l'obésité chez les adultes entre 2006 et 2016 à environ 17% hommes et femmes confondus. Cette stabilisation est aussi présente pour les enfants avec une prévalence d'environ 4% depuis 2006 (filles et garçons confondus). La France est l'un des premiers pays au monde à présenter cette stabilisation, probablement suite à la mise en place de **PNNS** (programme national nutrition santé) successifs dès 2001 (Verdot 2017), la 4<sup>ème</sup> version devrait démarrer cet automne. En France, malgré une tendance à la stabilisation au cours des dernières années, l'obésité reste un problème de santé publique majeur qui touche les deux sexes et toutes les générations.



**Figure 3. Comorbidités associées à l'obésité**

L'obésité est une pathologie favorisant le développement d'un grand nombre de comorbidités. Ces maladies non communicables ne se déclarent pas systématiquement chez les personnes obèses, elles participent cependant à faire de l'obésité l'un des principaux facteurs de risque de décès au niveau mondial.

Adapté de Upadhyay et al. 2017



**Figure 4. Facteurs influençant le développement de l'obésité et leurs interactions**

La cause fondamentale de l'obésité est un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. L'association d'une alimentation hypercalorique et d'une faible activité physique est le résultat de l'interaction de plusieurs facteurs biologiques, génétiques et environnementaux.

Adapté de [obesite.ulaval.ca](http://obesite.ulaval.ca)

### **1.3) Risques associés**

Selon l'OMS, l'obésité fait partie des 5 principaux facteurs de risque de mortalité au niveau mondial, les autres étant : une pression artérielle élevée, le tabagisme, l'hyperglycémie et la sédentarité. L'obésité est un facteur de risque pour plus d'une vingtaine de maladies chroniques et non-communicables telles que les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde), les accidents vasculaires cérébraux, le diabète de type 2, les dyslipidémies, des problèmes respiratoires (incluant l'apnée du sommeil), le syndrome des ovaires polykystiques, la stéatose hépatique, des troubles musculo-squelettiques (notamment l'arthrose) et certains cancers (sein, colon, foie) (**Figure 3**) (OMS 2018; Upadhyay et al. 2018). L'obésité infantile augmente le risque de décès prématuré et de handicaps à l'âge adulte. En plus de ces risques, de nombreux problèmes de santé sont associés à l'obésité chez l'enfant : troubles respiratoires, risques de fracture osseuse, atteinte cardio-vasculaire, résistance à l'insuline et troubles psychologiques (OMS 2018).

### **1.4) Etiologie de l'obésité**

#### **1.4.1) Causes de l'obésité**

Selon l'OMS, “la cause fondamentale de l'obésité et du surpoids est un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées”. Les modes de vie ont évolué au cours des dernières décennies que ce soit dans les pays à haut ou à faible revenus. L'augmentation de la consommation d'aliments à haut indice calorique, riches en glucides simples et en lipides saturés, est constatée au niveau mondial en parallèle d'une diminution de l'activité physique liée principalement à un mode de vie sédentaire associé à l'évolution des modes de transport (OMS 2018). D'autres facteurs environnementaux sont évoqués, tels que l'usage de médicaments, le statut socio-économique, le manque de sommeil ou les rythmes de vie décalés, les perturbateurs endocriniens, les contaminants alimentaires, la pollution environnementale ou encore un déséquilibre du microbiote gastro-intestinal (**Figure 4**) (Goodarzi 2018; Upadhyay et al. 2018).

Ces facteurs favorisant l'obésité (dits obésogènes) n'expliquent pas à eux seuls l'augmentation de la prévalence de l'obésité au niveau mondial. Tous les individus qui y sont exposés ne deviennent pas obèses, ce qui suggère l'implication d'interactions complexes entre facteurs génétiques et environnementaux. Plusieurs gènes contribuant à l'obésité ont été

identifiés, mais peu d'individus présentent une forme d'obésité monogénique. Plus de 200 types de mutations monogéniques sont associées au développement de l'obésité, et peu d'entre elles expliquent plus de 10% des cas d'obésité extrême (Upadhyay et al. 2018). Les études d'associations pan-génomiques (ou **GWAS**, pour *genome-wide association study*) prenant en compte des facteurs autres que l'IMC ont permis d'accélérer la recherche sur la génétique de l'obésité. Ces études ont ainsi identifié plusieurs loci associés à des traits d'adiposité, chacun d'eux participe à l'augmentation du risque de développer une obésité (Goodarzi 2018).

Cependant, ces facteurs environnementaux et génétiques n'expliquent pas totalement l'aggravation de l'épidémie d'obésité à laquelle nous devons faire face au niveau mondial, en particulier l'augmentation de l'obésité chez les enfants et sa déclaration de plus en plus précoce. Un environnement délétère précoce pourrait notamment prédisposer les enfants à développer une obésité par des mécanismes de conditionnement ou de programmation. Ce concept des **Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD** pour *Developmental Origins of Health and Disease*) est développé dans la partie 2 de ce chapitre. De plus en plus de travaux suggèrent que les processus épigénétiques pourraient contribuer à cette épidémie d'obésité, ce qui sera développé dans la suite de cette introduction (Anne Gabory 2011; Panchenko et al. 2016).

### **1.4.2) Physiopathologie de l'obésité**

L'obésité, maladie pléiotrope, se manifeste entre autres par un déséquilibre entre les calories apportées à l'organisme par l'alimentation et les dépenses énergétiques (métabolisme de base, thermogenèse et activité physique). L'augmentation des apports caloriques et la diminution de la dépense énergétique entraînent une augmentation du tissu adipeux, principalement du TAB. Ce tissu est composé de types cellulaires hétérogènes (adipocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules souches mésenchymateuses), une forte vascularisation et innervation. Les adipocytes sont le type cellulaire majoritaire du TAB et l'augmentation de la masse adipeuse est due à leur augmentation de taille (hypertrophie) ou de nombre (hyperplasie) (Carobbio, Pellegrinelli, et Vidal-Puig 2017).

Dans le cas d'un excès énergétique continu, le métabolisme lipidique est perturbé dans le TAB, la lipolyse est augmentée tandis que la  $\beta$ -oxydation est réduite. Le résultat de ces dysfonctions est une accumulation ectopique de lipides dans d'autres organes (comme le foie,

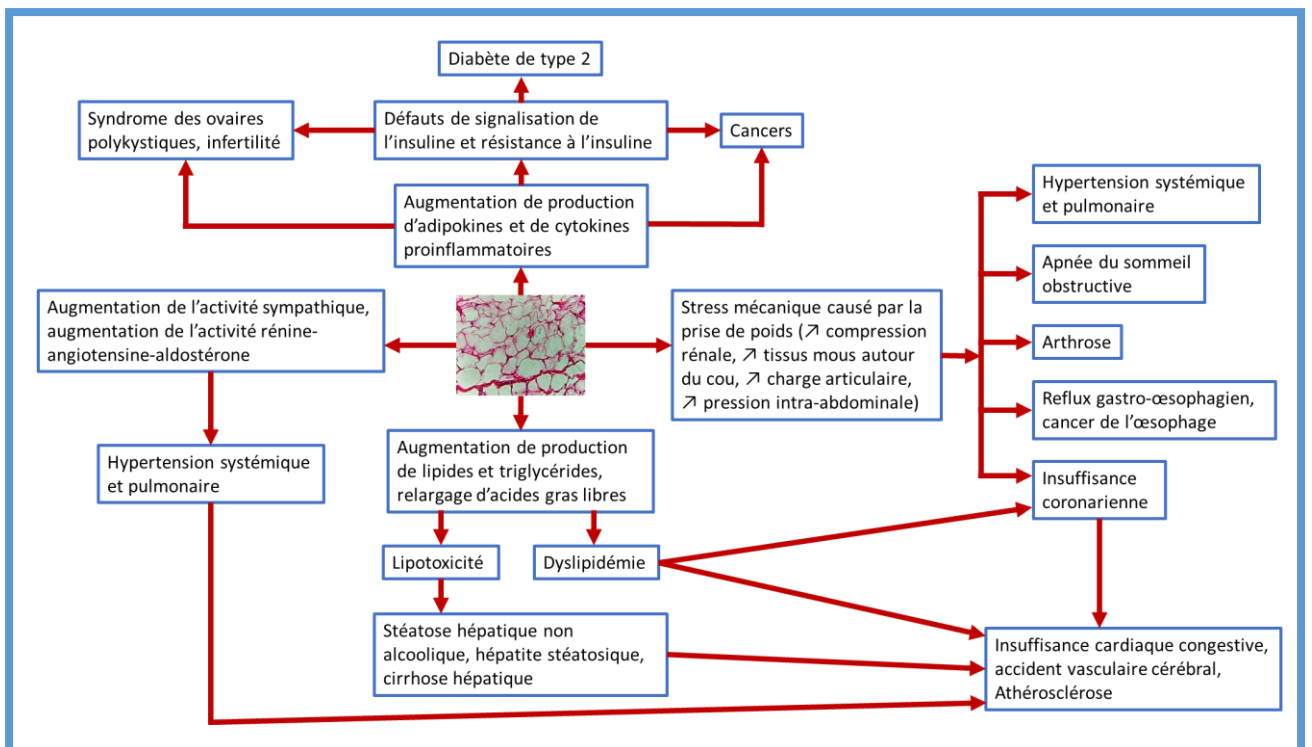


Figure 5. Voies par lesquelles l'obésité mène à des comorbidités

Adapté de Upadhyay et al. 2017

le cœur, les muscles), entraînant les dysfonctionnements observés dans le syndrome métabolique. Chez les personnes obèses, le TAB présente une infiltration et une accumulation de macrophages. Cela mène à une production chronique de facteurs inflammatoires, tels que des cytokines, participant aux altérations observées dans le syndrome métabolique (**Figure 5**) (Carobbio, Pellegrinelli, et Vidal-Puig 2017; Pirola et Ferraz 2017). Le TAB est un organe endocrine qui joue un rôle complexe dans le maintien de l'homéostasie hormonale. La production de différentes adipokines est dérégulée en cas d'obésité, ce qui pourrait contribuer à l'apparition de l'insulino-résistance périphérique observée en cas d'obésité. La production de leptine, une hormone majeure de l'homéostasie énergétique, est augmentée ce qui peut entraîner une dérégulation de la balance énergétique (apports/dépenses) et des réponses immunitaires et inflammatoires (Carobbio, Pellegrinelli, et Vidal-Puig 2017).

Le TAB a donc un rôle non seulement de stockage des réserves énergétiques mais il produit aussi des cytokines et des adipokines, nécessaires à la régulation de la balance énergétique par le SNC et à des voies de signalisation de l'insuline. De plus, il procède à un relargage d'acides gras (**AG**), de lipides et de TG, stockés en périphérie en cas d'obésité.

Le foie est l'organe primordial du métabolisme énergétique (lipidique, glucidique et protéique). En cas d'obésité, ses fonctions de détection des nutriments et de contrôle du métabolisme sont affectées et l'accumulation ectopique de lipides peut entraîner de nombreux dysfonctionnements (Trefts, Gannon, et Wasserman 2017). Son rôle sera développé dans le chapitre II.

Un des organes principaux du contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques est le système nerveux central (**SNC**), notamment via l'action de la leptine. En particulier, l'hypothalamus est un acteur clé de la régulation de la balance énergétique et des mécanismes de satiété et d'addiction, tandis que le bulbe olfactif participe à la reconnaissance et la préférence alimentaire ainsi qu'à la détection des nutriments (Dearden et Ozanne 2015; Riera et al. 2017). Leurs rôles respectifs seront développés dans le chapitre III.

**Un dialogue optimal entre le TAB, le SNC et le foie est donc primordial. Son altération conduit au déséquilibre métabolique associé à l'obésité.**

## 2) Obésité maternelle dans le contexte de la DOHaD

### 2.1) Définition de la DOHaD

La notion de programmation foetale développée par Barker dans les années 80 (Barker D. J. P. et Osmond C. 1986; D. J. Barker et al. 1989) évolue vers le concept des **origines développementales de la santé et des maladies (ou DOHaD, pour « *developmental origins of health and diseases* » en anglais)**. Ce concept postule que l'exposition à un environnement délétère, au cours des phases précoces du développement (préconception, gestation, post-natal précoce), peut impacter de façon importante la santé de l'individu au cours de sa vie adulte, en augmentant le risque de développer des maladies chroniques (obésité, diabète, troubles cardio-vasculaires, cancers, affections respiratoires chroniques). L'exposition à l'environnement renvoie essentiellement à tout ce qui n'est pas génétique, c'est-à-dire à des facteurs de stress chimiques et physiques, à des facteurs biologiques, au stress psycho-social, ainsi qu'aux expositions cumulatives. Ces différents éléments peuvent être regroupés sous la notion d'exposome (Barouki et al. 2018). Plus récemment, le terme de « conditionnement développemental » a été utilisé pour désigner ce concept. A la différence de la programmation développementale, pour laquelle seul l'évènement précoce est nécessaire, le conditionnement nécessite un facteur « révélateur » (par exemple un régime obésogène) afin d'avoir un effet sur le phénotype (Hanson et Gluckman 2014).

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées dans ce domaine et ce, depuis les années 1970 avec les travaux de Forsdahl. Ces travaux ont démontré que des conditions de vie précaires au cours de l'enfance suivies d'une suralimentation à l'âge adulte contribueraient au développement de troubles cardio-vasculaires (Forsdahl 1977). Différentes études de cohortes ont permis de démontrer le lien entre la restriction nutritionnelle périnatale et le développement de troubles métaboliques, cardio-vasculaires, ou psychiatriques à l'âge adulte. C'est notamment le cas de la famine Irlandaise (D. J. Barker et al. 1989; D. J. P. Barker et al. 2010) ou de la famine Hollandaise (Ravelli et al. 1999; Schulz 2010; Roseboom et al. 2011) pendant lesquelles le faible apport nutritionnel durant la grossesse a entraîné des **retards de croissance intra-utérins (RCIU)** associés au développement des troubles susmentionnés, selon le trimestre d'exposition. Le RCIU est caractérisé par une rupture de croissance foetale, après 5 mois de grossesse, associé à un nouveau-né petit pour l'âge gestationnel (poids < 10<sup>ème</sup> percentile, corrigé pour l'âge gestationnel). Plusieurs études réalisées sur des modèles animaux suggèrent le lien entre la restriction nutritionnelle périnatale et les conséquences à

long terme sur la descendance (Lois M. Roeder et Bacon F. Chow 1972; Hoet et Hanson 1999). Ces travaux ont contribué à démontrer que la nutrition maternelle est un facteur important de la DOHaD. Par la suite, différents travaux ont démontré l'impact d'un environnement *in utero* délétère sur la structure et donc la fonction des organes de la descendance (Taylor et Poston 2007; Fernandez-Twinn et Ozanne 2010). La sous-nutrition et la surnutrition ou l'obésité maternelle au cours de phases critiques du développement peuvent prédisposer la descendance au syndrome métabolique à l'âge adulte.

De plus en plus d'études attestent également d'une influence de l'environnement nutritionnel paternel sur le phénotype de la descendance (Dunford et Sangster 2017). Chez les rongeurs, les descendants de pères obèses présentent un retard de croissance fœtal et placentaire ainsi qu'un retard post-natal de croissance et de maturation des organes (Binder, Hannan, et Gardner 2012; Lecomte et al. 2017). A plus long terme, l'obésité paternelle mène à des altérations chez la descendance à différents niveaux : homéostasie du glucose et de l'insuline, lipogenèse hépatique, comportement nutritionnel, altération du potentiel reproductif (Ornellas et al. 2017). Les mécanismes en jeu pour expliquer ces phénomènes seraient d'ordre épigénétique, via des modifications chimiques des acides désoxyribonucléiques (ADN), des histones ou encore via les acides ribonucléiques (ARN) et micro ARN apportés par le spermatozoïde (Junien et al. 2016; Masuyama et al. 2016; Dunford et Sangster 2017; Dupont et al. 2019).

Dans le contexte de cette thèse, la suite de l'introduction sera centrée sur les effets de l'obésité et de la surnutrition maternelle sur la santé des descendants à court et long terme.

## **2.2) Preuves du conditionnement développemental induit par l'obésité maternelle chez l'humain**

### **2.2.1) Prévalence de l'obésité chez les femmes en âge de procréer**

Dans le monde, la prévalence de l'obésité a atteint 15% chez les femmes en âge de procréer en 2016 (OMS 2018). Ce taux varie en fonction de la zone géographique de manière dépendante du niveau économique et des habitudes alimentaires locales. Les taux les plus alarmants se retrouvent dans des états insulaires (>50%), dans certains pays du Moyen-Orient, de l'Afrique du Nord, d'Amérique du Nord et Centrale et en Afrique du Sud (>30%). A titre d'exemples, en 2016 la prévalence de l'obésité dans la population féminine des Etats-Unis



d'Amérique et des Emirats Arabes Unis était de 38,2% et 42,5%, respectivement (NCD-RisC 2017) (**Figure 1.A**).

En France, en 2012, la prévalence de l'obésité chez les femmes de 18-24 ans était de 6% tandis que chez les femmes de 25 à 34 ans cette proportion a augmenté et atteint 11,1% (ObEpi 2012). L'étude Esteban-2015 estime que la prévalence de l'obésité chez les femmes âgées de 18 à 39 ans est de 11,3% (Verdot 2017). Globalement, ces enquêtes montrent qu'au niveau mondial de plus en plus de femmes en âge de procréer sont obèses. Comme pour la population générale, les plans d'amélioration de la santé de la population, tels que le PNNS, peuvent contribuer à freiner cette évolution au niveau national.

### **2.2.2) Complications associées à l'obésité**

L'obésité entraîne des risques pour la mère et l'enfant. Avant la grossesse, l'obésité maternelle entraîne des troubles de la fertilité : les femmes avec un IMC  $\geq 29$  kg/m<sup>2</sup> ont plus de difficultés à procréer que des femmes avec une corpulence dans la norme (Haute Autorité de Santé 2011). L'obésité gestationnelle est associée à de nombreux risques pour la santé de la mère : **avant l'accouchement**, hypertension artérielle, diabète gestationnel, pré-éclampsie, risque d'accouchement par césarienne et, après l'accouchement, complications thromboemboliques (C. Y. W. Lee et Koren 2010; Haute Autorité de Santé 2011; Upadhyay et al. 2018). Les risques vont au-delà de la grossesse car les femmes ayant un diabète gestationnel ont 7 fois plus de risque de développer un diabète de type 2 (Bellamy et al. 2009). L'obésité gestationnelle est associée à un surcroît du taux de mortalité périnatale (enfants mort-nés ou décédés dans les 28 jours suivant la naissance). De plus, l'obésité maternelle augmente le risque de malformations congénitales, parmi lesquelles les plus fréquentes sont l'hydrocéphalie, les anomalies cardio-vasculaires, les défauts de fermeture du tube neural ou de la fente labio-palatine (C. Y. W. Lee et Koren 2010; Haute Autorité de Santé 2011).

### **2.2.3) Conditionnement du phénotype de la descendance par l'obésité maternelle**

Selon plusieurs études, des changements indésirables dans le phénotype métabolique maternel (obésité, diabète, sous-nutrition) avant, pendant ou après la grossesse, compromettent le développement de la descendance en contribuant à un environnement périnatal défavorable (Dearden et Ozanne 2015). A court terme, l'obésité maternelle est

associée à une augmentation du risque de nouveau-né petit pour l'âge gestationnel ou de macrosomie fœtale (poids > 90<sup>ème</sup> percentile corrigé pour l'âge gestationnel) et post-natale (poids de naissance > 4 kg) ainsi que de naissances prématurées, d'adiposité augmentée ou d'hyperglycémie chez la descendance (Rajasingam et al. 2009; P. M. Catalano et al. 2009; Gaudet et al. 2014). A titre d'exemple, la macrosomie à la naissance est associée chez le jeune adulte à un risque accru de développer une obésité ou des maladies non communicables chroniques telles que le diabète ou des pathologies cardio-vasculaires (Poston 2012).

De multiples études ont montré une corrélation positive entre l'IMC maternel préconceptionnel et le surpoids / l'obésité infantile (Mitanchez et Chavatte-Palmer 2018). Chez les femmes obèses ou en surpoids avant la conception, le poids des nouveau-nés est plus élevé que celui de femmes avec un IMC dans la norme (Adane et al. 2018). Ces résultats ont été obtenus dans une étude longitudinale australienne portant sur une cohorte de 1606 femmes, les 6-7 ans précédents la conception et chez leurs enfants (2733) entre 2 et 13 ans. Le suivi longitudinal a de plus permis de démontrer une association de type dose-réponse entre l'IMC maternel préconceptionnel et celui des descendants pendant l'enfance. Ces résultats sont semblables à ceux d'études plus anciennes et correspondent aux conclusions obtenues lors d'une méta-analyse réalisée sur 25 études de cohortes indépendantes, correspondant à 196670 participantes (Weisman et al. 2011; P. M. Catalano et al. 2009; LifeCycle Project-Maternal Obesity and Childhood Outcomes Study Group et al. 2019). Une autre méta-analyse de 37 études de cohortes correspondant à 162129 mères a été réalisée et confirme cette corrélation. Les proportions estimées de surpoids et d'obésité infantiles attribuables au surpoids et à l'obésité maternelle préconceptionnelle sont respectivement de 11,5% et 10,2% pour les enfants de 2-5 ans, 15,1% et 14,4% pour les 5-10 ans, 20,1% et 21,6% pour les 10-18 ans. Le gain de poids maternel gestationnel a lui aussi un effet sur le poids de la descendance, les proportions de surpoids et d'obésité infantiles qui lui sont attribuables sont de 11,4% (2-5 ans), 15,4% (5-10 ans) et 19,2% (10-18 ans) (Voerman et al. 2019).

A plus long terme, il a été démontré à plusieurs reprises que l'obésité maternelle favorise le développement de troubles cardio-métaboliques à l'âge adulte tels que l'obésité ou le diabète (Godfrey et al. 2017). De plus, l'obésité maternelle est associée à une augmentation du risque de développer une stéatose hépatique non-alcoolique (**NAFLD** pour *non-alcoholic fatty liver disease* en anglais) chez les descendants à l'adolescence ou à l'âge adulte (C. Lynch, Chan, et Drake 2017). Des troubles musculo-squelettiques tels que l'arthrose ou

l'ostéoporose, peuvent aussi résulter de l'exposition à une obésité maternelle (Antoniades 2003). L'obésité maternelle peut aussi avoir des conséquences à long terme sur les fonctions respiratoires de la descendance, en favorisant le développement d'asthme ou les infections respiratoires (McGillick et al. 2017). Bien que moins nombreuses, des études ont aussi démontré l'impact de l'obésité maternelle sur le risque de développer des troubles neurocognitifs et comportementaux. Il est notamment rapporté un risque accru de développement de troubles de l'anxiété ou de la concentration, de problèmes d'addiction, d'anorexie, de boulimie ou encore de schizophrénie (Rivera, Christiansen, et Sullivan 2015; Edlow 2017). De manière intéressante, dans un environnement obésogène, le conditionnement de la descendance ne s'exprime pas toujours de la même façon en fonction du sexe. Il existe un dimorphisme sexuel dans ce conditionnement de la descendance (Junien, Gabory, et Attig 2012; Ribaroff et al. 2017). Ce dimorphisme sexuel en réponse à l'environnement périnatal nécessite cependant de plus amples investigations.

Les études de cohortes de femmes obèses ont toutefois quelques limitations lorsqu'il s'agit d'études à long terme, voire transgénérationnelles. En effet, de telles études nécessitent un temps conséquent et les données enregistrées ne sont pas toujours contrôlées, comme dans le cas de suivis auto-reportés (Maukonen, Männistö, et Tolonen 2018). De plus l'environnement socio-culturel et la génétique des individus peuvent être des sources de biais importants. Le mode de vie familial joue un rôle prépondérant dans l'installation de l'obésité chez l'enfant, en fonction des habitudes et traditions alimentaires ou encore de la pratique (ou de l'absence de pratique) d'activités sportives (A. L. Thompson 2013).

**Afin de limiter l'impact de ces facteurs environnementaux et génétiques, des modèles animaux sont utilisés.** Ils permettent de contrôler les conditions d'exposition *in utero* ainsi que de limiter les biais liés à la génétique par l'utilisation de lignées à fond génétique contrôlé. De plus, l'utilisation de modèles animaux permet d'étudier la susceptibilité de la descendance à développer des maladies à des stades précoces ainsi que les mécanismes sous-jacents. Les modèles animaux majoritairement utilisés dans la thématique de l'obésité sont les rongeurs, les moutons, les porcs, les lapins et les primates non humains (en particulier le macaque) (Reynolds, Segovia, et Vickers 2017; Chavatte-Palmer, Tarrade, et Rousseau-Ralliard 2016).

## 2.3) Modèles animaux d'obésité maternelle

### 2.3.1) Modèles animaux et modalités de prise de poids

Chez les rongeurs, comme chez l'humain, les cas d'obésités mono- et poly-géniques sont rares (souris *ob/ob* par exemple) (Yazdi, Clee, et Meyre 2015). L'obésité est généralement induite par l'alimentation. Les animaux sont nourris avec des régimes dits obésogènes, par comparaison à des régimes dits « contrôles » ou « chow-diet », pour lesquels le phénotype est considéré comme normal.

Ces régimes peuvent être de différentes natures, avec des compositions variables en macronutriments : régime hyperlipidique (**HFD**, pour *high fat diet*), régime hyperglucidique, régime hyperglucidique et hyperlipidique (**HFS** pour *high-fat/high-sugar diet*), régime dit « cafétéria » ou encore régime occidental (**WSD** pour *western-style diet*). Le régime « cafétéria » décrit un mélange de nourriture grasse et/ou sucrée, ultratransformée industriellement et habituellement consommée par les humains (« *junk-food* »). Sa composition exacte n'est donc pas toujours connue, tandis que la proportion des macronutriments est bien définie dans les formulations récentes de WSD (Ribaroff et al. 2017; Bortolin et al. 2018). Dans la littérature scientifique, il existe un très grand nombre d'études au sujet de l'influence de l'obésité et/ou du régime obésogène maternel sur la santé de la descendance (Williams et al. 2014; Ribaroff et al. 2017).

A court terme, l'obésité maternelle a des effets sur le poids fœtal de la descendance, adaptation précoce permettant d'assurer la survie du fœtus. Ces effets sont variables en fonction de la lignée de souris utilisée, de l'espèce animale étudiée ou encore de la composition du régime, induisant soit un RCIU, ou au contraire, une macrosomie fœtale (Williams et al. 2014; Chavatte-Palmer, Tarrade, et Rousseau-Ralliard 2016). De plus, l'obésité maternelle impacte l'expression des gènes de différents tissus, tels que le foie ou le placenta (Tarrade et al. 2013; Panchenko et al. 2016). Ces gènes sont associés au métabolisme énergétique et à l'inflammation, mais aussi à la machinerie épigénétique. Ces modifications d'expression peuvent avoir lieu à différents stades du développement et sont associées à une altération des fonctions placentaires (A. Gabory, Attig, et Junien 2011; Panchenko et al. 2016). Des effets cérébraux ont aussi été constatés : perturbation de la neurogenèse ainsi que de la signalisation neuronale, modification d'expression des gènes, modifications des projections neuronales (Dearden et Ozanne 2015).

A plus long terme, le régime HFD maternel a un effet de conditionnement sur plusieurs paramètres liés au syndrome métabolique chez la descendance. Une méta-analyse récente, réalisée par Ribaroff *et al.*, a repris les données de 171 études expérimentales sur différents modèles animaux, afin d'évaluer l'impact du régime HFD maternel sur la santé de la descendance (Ribaroff et al. 2017). Chez la souris, si l'effet sur le poids de naissance n'est pas clair, le régime HFD est associé à une augmentation du poids au sevrage ainsi qu'à l'âge adulte. L'adiposité est aussi augmentée, mais pas systématiquement chez les femelles. La triglycéridémie et la cholestérolémie sont généralement plus élevées chez les descendants de mères sous régime HFD. Une hyperinsulinémie est observée chez les descendants mâles et femelles, mais elle s'accompagne d'une hyperglycémie uniquement chez les femelles (Ribaroff et al. 2017). D'autres effets sont décrits dans la littérature, tels que le développement d'une résistance à l'insuline ou une intolérance au glucose, une hypertrophie des adipocytes associée à une hyperphagie, une diminution de l'activité locomotrice et de la masse musculaire (Alfaradhi et Ozanne 2011).

Un régime HFD chez la mère est associé au développement d'une stéatose hépatique, qui consiste en une accumulation de lipides dans le foie, chez sa descendance (Wesolowski et al. 2017). Cet aspect sera détaillé dans le Chapitre II de l'introduction.

Plusieurs études ont aussi mis en évidence l'impact du régime HFD maternel sur différents paramètres comportementaux. Les souriceaux développent une préférence pour les aliments gras et/ou sucrés, accompagnée d'une dérégulation de l'expression des gènes dans le système méso-limbique, le circuit de la récompense et l'**hypothalamus** ainsi qu'une désorganisation des circuits neuronaux (Dearden et Ozanne 2015). L'alimentation maternelle a un effet sur les **facultés olfactives**. Des études ont montré tout d'abord une influence du régime alimentaire maternel sur la préférence alimentaire (Nicolaïdis 2008; Beauchamp et Mennella 2009). Plus récemment, des preuves de la modification du comportement olfactif en réponse au régime obésogène maternel ont été obtenues chez les descendants en surpoids au sevrage (Merle et al. 2019). Les aspects concernant le SNC, en particulier l'**hypothalamus** et le **bulbe olfactif**, seront développés dans le Chapitre III de cette introduction.

### **2.3.2) Fenêtres critiques de l'influence de l'obésité maternelle sur la descendance**

Les effets de l'obésité maternelle dépendent de la **durée** et de la **période** pendant laquelle la descendance y a été exposée, indirectement (exposition gamétique et *in utero*) ou

Publication	Préconception	Gestation	Lactation	Effets reportés
Howie et al., 2009 Rat Wistar HFD 45%				Restriction de croissance foetale, hypoleptinémie et hypoinsulinémie à la naissance, obésité, hyperleptinémie et hyperinsulinémie adulte Restriction de croissance foetale, hypoleptinémie et hypoinsulinémie à la naissance, obésité, hyperleptinémie et hyperinsulinémie adulte
Gregorio et al., 2010 Souris C57BL/6 HFD 49%				Poids, glycémie, cholestérol, résistance à l'insuline, stéatose hépatique Poids, triglycérides, stéatose hépatique Poids, cholestérol, stéatose hépatique
Plata et al., 2014 Souris CD1 HFD 35,5%				HF C-HF HF-C C Restriction de croissance foetale, expression génique dans le foie, inflammation hépatique Restriction de croissance foetale, expression génique dans le foie, hyperglycémie, inflammation hépatique Restriction de croissance foetale
Sasson et al., 2015 Souris C57BL/6J HFD 60%				Restriction de croissance foetale, ↗ poids à la naissance Restriction de croissance foetale, ≠ poids à la naissance. Obésité, intolérance au glucose, hyperleptinémie adulte Restriction de croissance foetale, ↘ poids à la naissance
Sun et al., 2012 Rat SD HFD 60%				↗ poids à la naissance, adiposité, leptinémie, glycémie, insuliniémie, mâles et femelles résistants à la leptine (PND10 et PND21) ↘ glycémie et insuliniémie basale (vs C-C), ↗ glucose AUC, mâles et femelles résistants à la leptine (PND10), ↗ poids à la naissance, adiposité, leptinémie, glycémie, insuliniémie, mâles et femelles résistants à la leptine (PND21)
Vogt et al., 2014 Souris C57BL/6 HFD 35,5%				↗ insuliniémie, poids, adiposité, leptinémie, résistance à l'insuline, intolérance au glucose : ♂ CD ou HFD et ♀ HFD. Perturbation hypothalamiques ↗ insuliniémie, poids, adiposité, leptinémie, résistance à l'insuline, intolérance au glucose : ♂ CD ou HFD et ♀ HFD. Perturbation hypothalamiques
Oben et al., 2010 Souris C57BL/6J Cafeteria style				Fibrose hépatique et résistance hépatique à l'insuline Fibrose hépatique et résistance hépatique à l'insuline ↗ poids corporel, insuliniémie, leptinémie, pression systolique, fibrose hépatique plus importante et développement de NAFLD
Pomar et al., 2017 Rat Wistar HFD 60%				↘ poids corporel, taille de naissance, masse maigre, ↗ masse grasse, leptinémie, NEFA plasmatique, triglycéridémie, OGTT AUC poids mères HFD inchangé, adiposité augmentée, TG du lait augmentés
Vithayathil et al., 2018 Rat Wistar Albino Cafeteria				↘ poids et taille de naissance, ↗ adiposité, glycémie et leptinémie à 3 semaines ↗ glycémie à 3 semaines ↘ poids et taille de naissance, ↗ adiposité, leptinémie à 3 semaines
Butruille et al., 2019 Rat Cafeteria				↗ poids corporel, adiposité pendant lactation. Hyperphagie, ↗ adiponectine plasma, adiposité et prise de poids adulte Poids mères CAF inchangé, FA du lait augmenté
Monks et al., 2018 Souris C57BL/6 HFD 60%				lait avec -24% TG, ↘ atteinte hépatique à l'âge adulte, ↗ dysfonctions mitochondriales ↗ poids ♀ au sevrage, ↗ poids ♂ post-puberté, ↗ dysfonctions mitochondriales, ↗ inflammation adipocytes ♂, ↗ dommages hépatiques
White et al., 2009 Rat Long-Evans HFD 60%				Effet maternel : ↗ poids corporel, leptine serum et lait. Effet descendance au sevrage : ↗ prise de poids, poids total, adiposité ++, leptinémie, ↗ résistance à l'insuline. Effet descendance adulte : ↗ poids corporel, expression NPY hypothalamique HFD, apport caloriel égal à CD Effet descendance au sevrage : ↗ adiposité
Malgorzata et al., 2016 Souris C57BL/6J HFD 60%				Epuisement des follicules primordiaux, inflammation ovarienne, surfertilité Epuisement des follicules primordiaux, inflammation ovarienne, surfertilité
Hryhorczuk et al., 2017 Rat Wistar HFD 50%				Huile d'olive - Effet sur la mère : ↗ adiposité périgonadique et périrénale, altération des fonctions et de la sensibilité de l'axe HPA Huile de palme - Effet sur la mère : ↗ adiposité périgonadique et périrénale, pic de corticostérone, altération fonctions et sensibilité de l'axe HPA

## Tableau 1. Fenêtres critiques d'influence de l'obésité et du régime maternel sur la descendance

Effets de l'exposition à un régime hypercalorique, au cours de différentes périodes du développement.

CD – régime contrôle (control diet, en vert) ; HFD – régime hyperlipidique (high-fat diet, en bleu avec régime cafétéria)

directement (période post-natale). Les périodes d'exposition majoritairement étudiées sont la **préconception**, la **gestation** et la **lactation** (**Tableau 1**). De manière générale, le régime HFD entraîne une augmentation de poids chez les descendants, indépendamment de la période d'exposition. Néanmoins, les paramètres métaboliques des descendants peuvent être impactés différemment en fonction de la période pendant laquelle l'exposition au régime a eu lieu.

Un nombre important d'études démontrent l'impact négatif de l'obésité maternelle au cours de la gestation ou bien de la lactation (**Tableau 1**). Les effets majoritaires observés en période **périnatale** sont : défauts de croissance fœtale, atteintes hépatiques, perturbations du métabolisme lipidique et/ou glucidique (**Tableau 1**). A plus **long terme**, la majorité de ces effets ont tendance à être amplifiés : dyslipidémie, obésité, intolérance au glucose et/ou résistance à l'insuline, hyperleptinémie, NAFLD (**Tableau 1**).

En explorant la littérature, il est toutefois possible d'obtenir des informations de la phase préconceptionnelle jusqu'aux périodes post-natales. Tout d'abord, une altération de la **gamétogenèse** est possible. Une étude transcriptomique sur cellules uniques montre la modulation de l'expression de gènes ovocytaires dans un **contexte d'obésité maternelle**. Cette modulation concerne notamment des gènes liés au développement neuronal, aux processus inflammatoires ou encore à des voies métaboliques cruciales telles que le métabolisme des lipides ou la signalisation de l'insuline (Ruebel et al. 2017). Il a de plus été démontré que l'obésité entraîne des dommages mitochondriaux, structurels et génomiques, qui s'accumulent et sont ensuite transmis à la descendance (Boudoures et al. 2017).

La **période préimplantatoire** est aussi sensible à des perturbations dues à la nutrition. Une **restriction protéique** maternelle au cours de cette période est suffisante pour causer des troubles cardio-métaboliques et neurologiques chez les descendants à l'âge adulte (Fleming, Eckert, and Denisenko 2017). Les conséquences de l'obésité maternelle lors de cette période sont encore trop peu étudiées, toutefois des études récentes rapportent elles aussi un impact négatif sur le phénotype cardio-métabolique et neurologique des descendants. L'exposition d'embryons préimplantatoires à des TG et des AG saturés amènent à des résultats similaires à ceux observés dans des modèles d'obésité induite (Broughton et Jungheim 2015).

Chez le rat, au **stade fœtal**, la **surnutrition** maternelle a des effets assez larges, allant du RCIU à la macrosomie, en fonction de la souche de rat et de la composition du régime. Le placenta joue un rôle primordial dans la mise à disposition des nutriments de la mère au fœtus,



et sa morphologie ainsi que ses fonctions sont altérées en cas de sous ou surnutrition maternelle (Sferruzzi-Perri et Camm 2016).

Enfin, la **période post-natale** est, elle aussi, sensible aux perturbations de l'environnement maternel. En effet, cette période influence le développement des circuits neuro-endocriniens, ce qui peut affecter le contrôle de l'appétit et le gain de poids à court et long terme (**Tableau 1**)(Vogt et al. 2014; Marseglia et al. 2015; Butruille et al. 2019). La composition du lait maternel, qui dépend directement du régime alimentaire suivi par la mère ainsi que de son état métabolique, pourrait participer à ces effets. En effet, sous régime HFD, le lait maternel présente une diminution des TG associée à une augmentation d'acides gras inflammatoires (AG polyinsaturés) et de la concentration en leptine. Ces modifications sont associées chez la descendance à une augmentation de la prise de poids au sevrage ainsi que de l'adiposité ou encore des dysfonctions mitochondriales, chez la souris et le lapin (Hue-Beauvais et al. 2017; Monks et al. 2018). Il est aussi nécessaire de tenir compte du comportement maternel et de ses interactions avec les descendants lors de cette période. Les descendants délaissés par leur mère ou séparés volontairement de cette dernière, présentent une augmentation des comportements de type dépressif et une altération de la capacité à répondre à un environnement nouveau ou aversif (Rincel et al. 2016). En comparaison, un haut niveau d'attention maternelle permet une meilleure résistance au stress chez les descendants, lié à une forte expression du récepteur aux glucocorticoïdes (**GR** pour *glucocorticoids receptor*) dans l'hippocampe, grâce à une hypométhylation de l'ADN du promoteur du gène du GR (Franklin et al. 2010; Hellstrom et al. 2012; Lester et al. 2018).

Au vu de ces différentes études et revues de la littérature, il est difficile de conclure qu'une de ces fenêtres soit plus importante qu'une autre dans le contexte de la lutte contre l'obésité. De plus, la méta-analyse de Ribaroff et al. met en évidence des faiblesses dans les design expérimentaux et un biais de publication (les résultats négatifs ne seraient pas publiés), ce qui complexifie l'obtention de conclusions tranchées (Ribaroff et al. 2017).

### **2.3.3) Effets respectifs du régime hyperlipidique et de l'obésité maternelle sur le phénotype de la descendance**

Il est en outre difficile de séparer l'impact de l'obésité maternelle (son état métabolique) de celui du régime maternel. Néanmoins, la littérature donne quelques éléments



permettant d'identifier la part de responsabilité de chacun de ces deux paramètres sur la santé de la descendance.

Peu d'études se sont intéressées à cette problématique spécifiquement, certains résultats expérimentaux incriminent le régime maternel plutôt que l'obésité, mais ces conclusions ne sont pas unanimes. Chez la souris, un régime hyperlipidique entraîne une subfertilité due à un épuisement des follicules primordiaux et une inflammation ovarienne (Skaznik-Wikiel et al. 2016). Chez le lapin, une atrésie folliculaire est observée, bien que la fertilité de la descendance ne soit pas affectée (Cordier et al. 2013; Léveillé et al. 2014). Ces effets sont constatés en présence ou en l'absence d'obésité maternelle, ce qui suggère un effet inhérent au régime hyperlipidique (Cordier et al. 2013; Léveillé et al. 2014; Skaznik-Wikiel et al. 2016). L'utilisation de souris susceptibles ou résistantes au développement d'une obésité a montré un effet protecteur de l'obésité maternelle sur la descendance (Monks et al. 2018). Sous régime HFD, les descendants de souris résistantes à l'obésité présentent une augmentation du poids, du sevrage jusqu'en post-puberté, associée à des dysfonctions mitochondriales, mises en évidence par la présence de méga mitochondries, et à des troubles hépatiques, tels que le développement d'une stéatose. En revanche, bien que présentant aussi des dysfonctions mitochondriales, les descendants de souris obèses seraient moins atteints au niveau hépatique (**Tableau 1**) (Monks et al. 2018). D'autres résultats sont moins favorables à cette hypothèse. Dans les expériences de pair-feeding (quantité de nourriture HFD limitée à l'équivalent calorique de celle consommée par les animaux contrôles), les descendants ne présentent qu'une augmentation de l'adiposité. En revanche, les descendants de mères ayant reçu le régime HFD *ad libitum* présentent une augmentation de la prise de poids, du poids total, de l'adiposité et de la leptinémie ainsi qu'une diminution de la tolérance à l'insuline (White, Purpera, et Morrison 2009).

L'étude des effets du régime HFD maternel au travers de différentes méta analyses permettent d'identifier le type de régime participant au conditionnement de troubles métaboliques chez la descendance (**Tableau 1**) (Lagisz et al. 2015; Ribaroff et al. 2017). Les effets du régime maternel dépendraient en partie de la quantité de macronutriments du régime. En effet chez le rat, une restriction alimentaire entraîne une restriction de croissance fœtale, puis une obésité accompagnée d'une dérégulation du métabolisme lipidique et glucidique à l'âge adulte. En revanche, un régime HFD en quantité limitée n'a pas d'effet sur le phénotype descendance (Desai et al. 2007; White, Purpera, et Morrison 2009). Cela pourrait être dû à

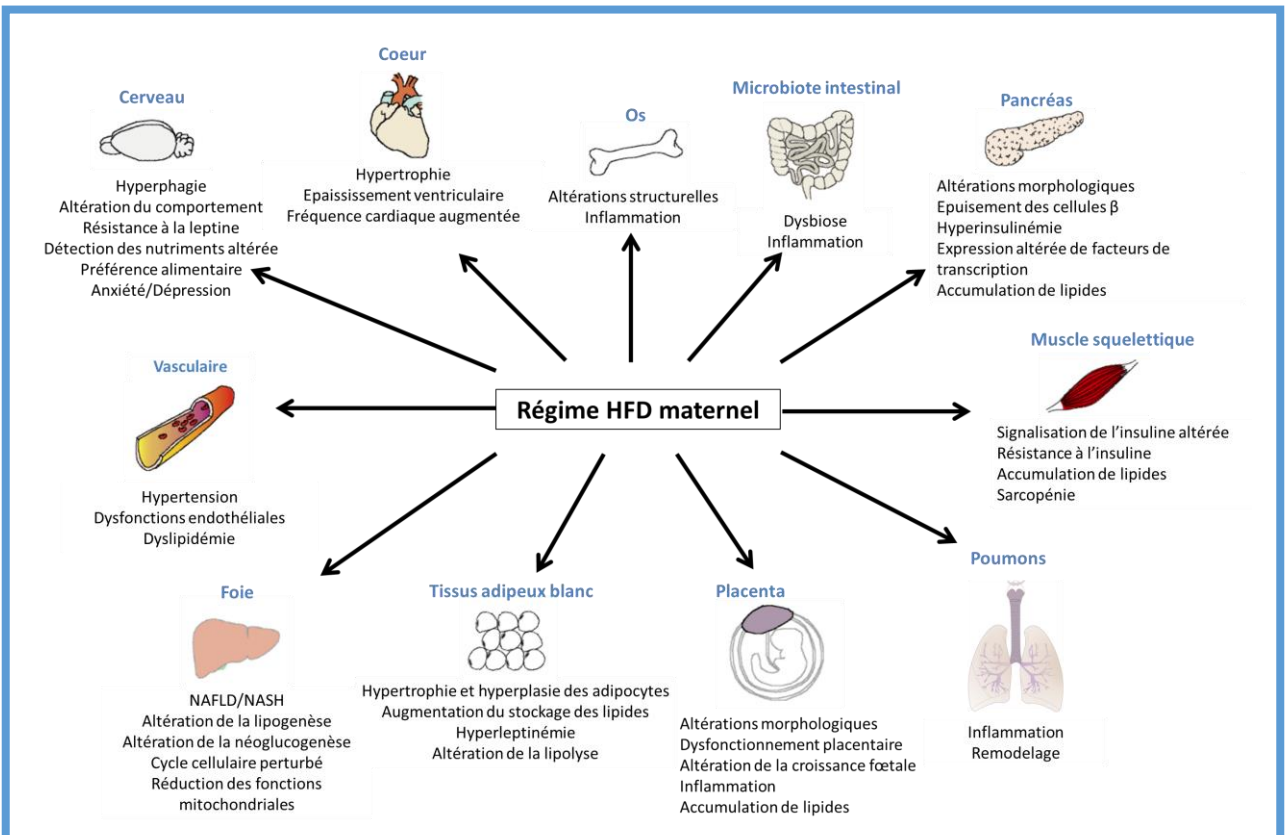
une modification de la biodisponibilité des macronutriments chez la descendance au stade *in utero* (Lagisz et al. 2015). Dans l'étude de Monks et al. chez la souris, l'atténuation de l'impact du régime HFD chez les descendants de mères sensibles à l'obésité pourrait être dû à une diminution de la proportion de TG dans le lait maternel (Monks et al. 2018). La qualité ou les différentes sources de lipides utilisées dans les formulations alimentaires peuvent aussi moduler les effets de ces régimes. Chez le rat mâle, un régime HFD n'aura pas le même effet si la source de lipides est de l'huile d'olive ou de l'huile de palme (Hryhorczuk et al. 2017). De plus chez le rat, la programmation de troubles cardio-métaboliques chez les descendants de mères HFD peut être atténuée lorsque les mères sont supplémentées en acides gras polyinsaturés (Gray et al. 2015). Cependant, la diversité des régimes utilisés dans les modèles expérimentaux rend difficile l'analyse des résultats et l'obtention de conclusions claires. Ceci met une fois encore en avant le besoin d'harmonisation des pratiques expérimentales (**Tableau 1**) (Ribaroff et al. 2017; Bortolin et al. 2018).

Le régime maternel, indépendamment de l'obésité maternelle, peut donc avoir un impact négatif sur la santé de la descendance. L'obésité semble aussi avoir un effet néfaste sur la descendance et les phénotypes les plus extrêmes sont généralement observés lorsque l'obésité est associée à un régime hyperlipidique et à un diabète gestationnel. La période et la durée d'exposition à l'environnement maternel peuvent entraîner des effets différents, suggérant différents mécanismes d'action. L'obésité maternelle et le régime hyperlipidique participent donc de façon indépendante au développement d'un phénotype de syndrome métabolique chez la descendance.

## **2.4) Mécanismes du conditionnement développemental par l'obésité maternelle**

### **2.4.1) Altération des systèmes biologiques de la descendance par l'obésité maternelle**

Depuis plusieurs années, différents mécanismes du conditionnement développemental sont mentionnés dans la littérature (Alfaradhi et Ozanne 2011; Williams et al. 2014; Wankhade, Thakali, et Shankar 2016). Le conditionnement et/ou la programmation fœtale du syndrome métabolique, induit par l'environnement maternel, est dû à l'altération précoce de plusieurs systèmes biologiques chez la descendance :



**Figure 6. Effets de la nutrition hyperlipidique et/ou de l'obésité maternelle sur les systèmes biologiques de la descendance**

Des altérations structurelles et fonctionnelles sont observées dans de nombreux organes en contexte de régime hyperlipidique et/ou d'obésité maternelle

L'ensemble de ces altérations interagissent avec l'environnement post-natal, ce qui peut aboutir à un syndrome métabolique à l'âge adulte.

NAFLD – Stéatose hépatique non alcoolique (non-alcoholic fatty liver disease), NASH – Stéatohépatite non alcoolique (non-alcoholic steatohepatitis)

Adapté de Williams et al. 2014

- Une dérégulation du comportement alimentaire et du système de récompense ainsi que de la dépense énergétique au niveau du **système nerveux central** (Vucetic et al. 2010; Daria Peleg-Raibstein, Luca, et Wolfrum 2012) ;
- Au niveau du **TAB**, une augmentation de la capacité de stockage des lipides (White, Purpera, et Morrison 2009) ;
- Une **inflammation hépatique** menant à la stéatose hépatique non-alcoolique (Bruce et al. 2009) ;
- Une dérégulation de l'**homéostasie glucidique** associée à une résistance à l'insuline entraînant un épuisement des **cellules  $\beta$  du pancréas** et une hyperglycémie (Gniuli et al. 2008) ;
- Une résistance à l'insuline au niveau des **muscles squelettiques**, associée à des troubles musculaires (Buckley et al. 2005) ;
- Une altération de la **masse osseuse**, en particulier sa capacité de minéralisation (Lanham et al. 2010) ;
- Une atteinte du **système cardio-vasculaire**, entraînant une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (Khan et al. 2005) ;
- Un **dysfonctionnement placentaire**, modifiant les apports nutritionnels et entraînant une inflammation au stade fœtal (A. E. Frias et al. 2011) ;
- Au niveau **pulmonaire**, une inflammation associée à un remodelage tissulaire (Y. Song et al. 2015) ;
- Une altération du **microbiote intestinal**, modifiant l'absorption des nutriments (J. Ma et al. 2014) ;

Au cours du développement intra-utérin, l'environnement peut impacter divers organes et leurs fonctions (**Figure 6**). Ces altérations structurelles et fonctionnelles peuvent entraîner des troubles de la santé à court et long terme chez la descendance. Les altérations du **foie** et du **SNC** sont deux facteurs majeurs du conditionnement et de la programmation développementale de la descendance.

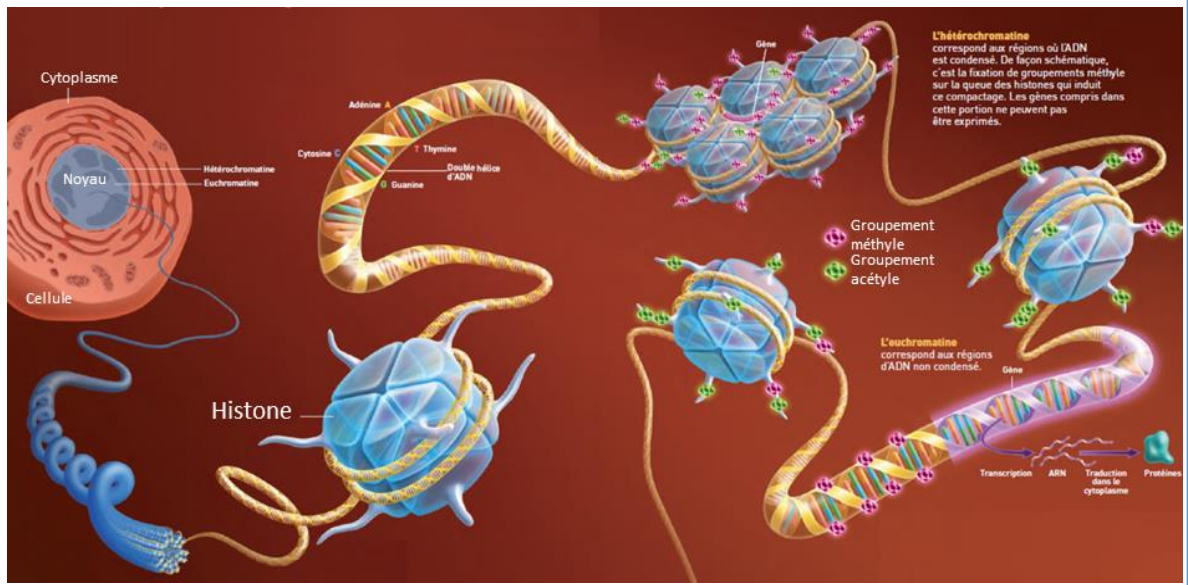


Figure 7. Régulation de la transcription génique par les marques épigénétiques

La chromatine est organisée sous forme d'un double brin d'ADN enroulé autour du nucléosome, un octamère protéique comprenant quatre dimères d'histones (H3, H4, H2a, H2b). Les extrémités N-terminales des histones sont orientées vers l'extérieur du nucléosome, elles sont alors accessibles aux enzymes de la machinerie épigénétique. Les groupements méthyles (en rose) sont apposés sur les dinucléotides CpG de l'ADN. L'acétylation des histones (en vert) est généralement associée à l'euchromatine, une région ouverte et accessible à la machinerie transcriptionnelle. La méthylation des histones peut être associée à des régions transcriptionnellement actives ou inactives, en fonction de la position spécifique de groupements méthyles sur les queues d'histone.

Adapté de Heard et al. 2012

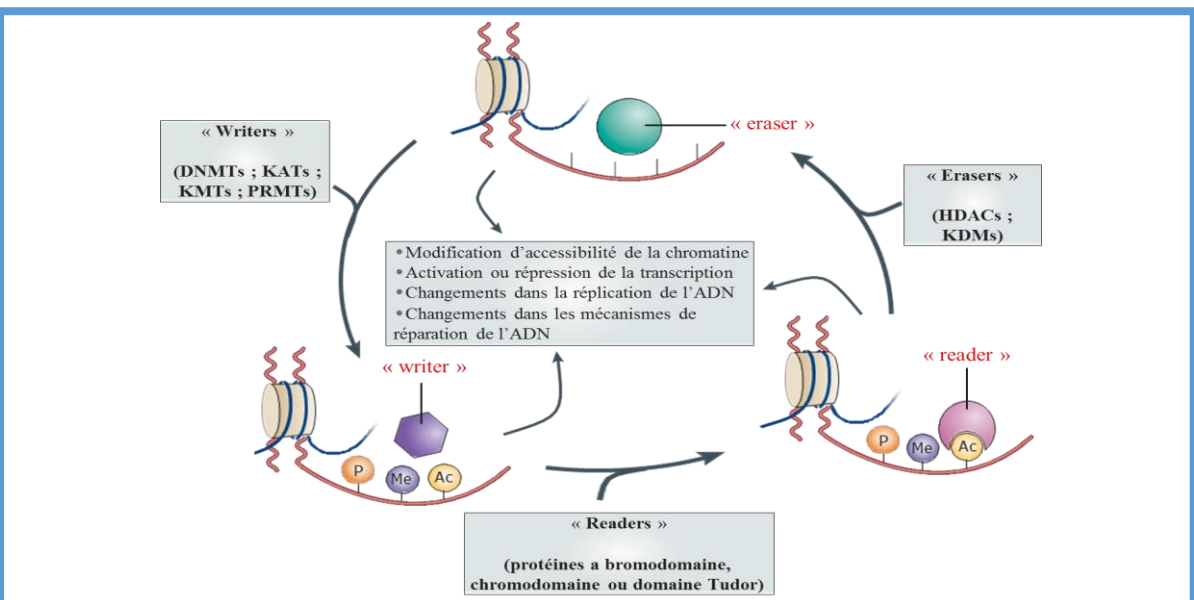


Figure 8. «Writers», «Readers» et «Erasers» des marques épigénétiques

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

Adapté de Falkenberg et Johnstone 2014

## 2.4.2) Mécanismes épigénétiques et obésité dans le concept de la DOHaD

### L'épigénétique et ses mécanismes

De nombreuses études montrent que les mécanismes épigénétiques, qui régulent l'expression des gènes sans changement de la séquence nucléotidique, sont impliqués dans la programmation et le conditionnement développemental. Les deux mécanismes principaux sont les modifications de la chromatine et les ARN non codants. Les modifications de la chromatine comprennent la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones et des autres protéines formant le nucléosome (**Figure 7**). Les modifications post-traductionnelles des histones consistent en l'apposition ou le retrait d'autres groupements chimiques sur les queues des histones, au niveau d'acides aminés (**AA**) spécifiques. Ces AA sont généralement des lysines, arginine, sérine, thréonine, tyrosine et histidines. Les principales modifications sont la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation. Ces modifications influent directement sur le degré de compaction de l'ADN et par conséquent sur le niveau d'expression des gènes (Z. J. Chen et Pikaard 1997). Les enzymes de la machinerie épigénétique régulent l'apposition ou l'effacement des marques épigénétiques. Celles qui apposent ces marques sont référencées dans la littérature comme « **writers** » (**écrivains**), tandis que celles qui les enlèvent sont appelées « **erasers** » (**effaceurs**) (**Figure 8**). La méthylation de l'ADN est assurée par les ADN-méthyltransférases (**DNMTs** pour *DNA methyltransferases*, en anglais). La déméthylation peut se faire de manière passive, ou bien de manière active, suivant un processus de modifications successives impliquant les enzymes TET (pour *ten-eleven translocation*, en anglais). La méthylation des histones est assurée par les lysine-méthyltransférases (**KMTs**) et la déméthylation par les lysine-déméthylases (**KDMs**). Les lysines-acétyltransférases (**KATs**) assurent l'apposition du groupement acétyle et l'effacement est assuré par les histones-désacétylases (**HDACs**). Il existe quatre classes d'HDACs, les enzymes de classe III étant appelées sirtuines (**SIRTs**). Les marques épigénétiques sont reconnues par différentes protéines appelées « **readers** » (**lecteurs**), possédant des domaines protéiques spécifiques (**Figure 8**). Ces readers du code épigénétique peuvent recruter des complexes multiprotéiques qui contribuent à la régulation de la transcription. Les marques épigénétiques sont flexibles, héritables au cours des divisions cellulaires successives et sensibles à l'environnement (Attig, Gabory, et Junien 2010; Anne Gabory 2011). Ces caractéristiques font des processus épigénétiques de bons candidats pour



Vitamines B, donneurs de méthyle, nutriments, micronutriments, composés bioactifs

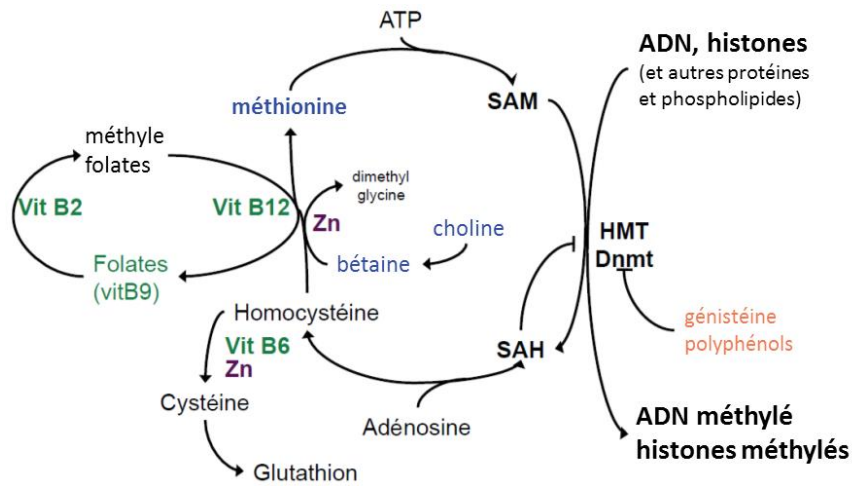


Figure 9. Métabolisme à un carbone (1C) et méthylation

Le métabolisme 1C utilise les composés apportés par l'alimentation afin de produire de la SAM. Cette molécule est un donneur de méthyle, essentielle à la méthylation de l'ADN et des histones. Certains composés alimentaire tels que les polyphénols ont la faculté d'inhiber les HMT et Dnmt.

ATP – adenosine triphosphate ; SAM – S-adenosylméthionine ; SAH – S-adenosylhomocystéine ; ADN – acide désoxyribonucléique ; HMT – histone méthyltransférases ; Zn – zinc ; Dnmt – ADN méthyltransférases ;

Adapté de Gabory A., conférence SAPS 2016

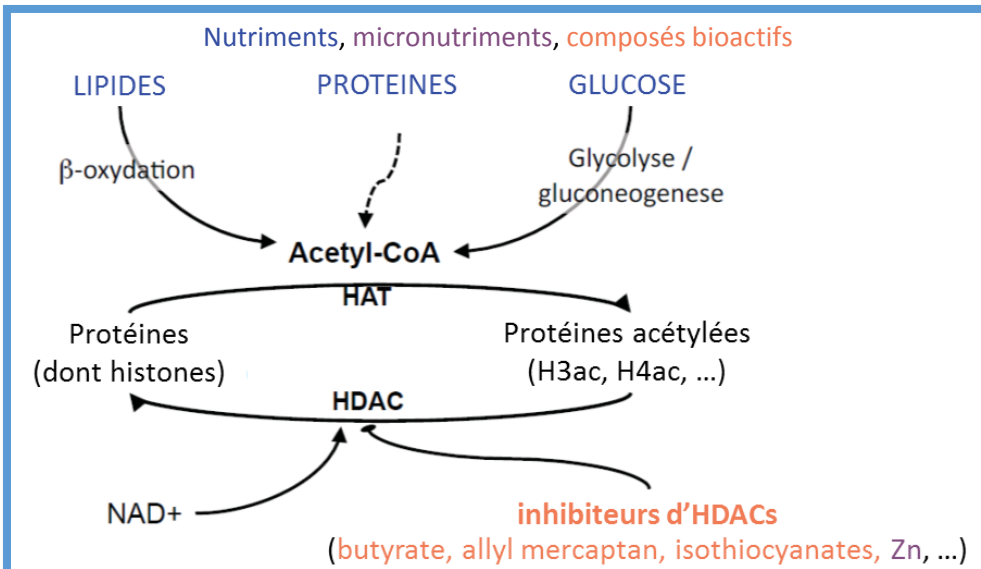


Figure 10. Métabolisme de l'acétate

Le substrat principal des réactions d'acétylation des protéines est l'acétyl-CoA. Cette molécule est apportée via la métabolisation des lipides, du glucose et des protéines. Certains composés présents dans l'alimentation (tel que l'allyl mercaptan, présent dans l'ail), ont une action inhibitrice sur les HDACs.

HAT – histone acétyltransférases ; HDAC – histone désacétylases ; H3ac – histone 3 acétylé ; H4ac – histone 4 acétylé ; NAD – nicotinamide adénine dinucléotide ; Zn - zinc

Adapté de Gabory A., conférence SAPS 2016

expliquer la « mémorisation » des événements environnementaux précoces. Cette mémorisation serait en partie responsable de la sensibilité de la descendance à son propre environnement, ainsi que des prédispositions à développer des pathologies (Warner et Ozanne 2010; Godfrey et al. 2017).

### **Métabolisme et épigénétique**

Le métabolisme, en particulier énergétique, entretient des liens étroits avec les mécanismes épigénétiques. Certains substrats du métabolisme énergétique sont des substrats ou des co-régulateurs de la machinerie épigénétique (Gabory A., under review).

La S-adénosine-méthionine (**SAM**) est le donneur universel de méthyle pour les méthyltransférases (Dnmt et HMT). Elle est fournie par le métabolisme monocarboné (1C, dit *one-carbon* en anglais). Plusieurs composés alimentaires tels que les vitamines B (comprenant les folates), la méthionine, la choline, la bétaine, contribuent à la production de SAM. D'autres composés alimentaires, tels que les polyphénols ou la tyrosine, peuvent moduler le cycle monocarboné et altérer les activités méthyltransférases (Delage et Dashwood 2008) (**Figure 9**). Un exemple édifiant du lien entre l'alimentation et la méthylation est apporté par l'étude des souris de souche « Agouti viable yellow » ( $A^{vy}$ ), chez lesquelles la couleur du pelage dépend de l'expression du gène *ASIP* (*agouti signalling protein*). L'expression de ce gène dépend de l'état de méthylation d'une séquence en amont de son promoteur. Lorsque l'alimentation des souris est supplémentée en donneurs de méthyle, la couleur du pelage de ces souris change graduellement, en fonction du degré de méthylation (Waterland et Jirtle 2003).

Les réactions d'acétylation des lysines utilisent l'acétyl-coenzyme A (**acétyl-CoA**) en tant que substrat. L'acétyl-CoA est un composant majeur du métabolisme énergétique, il intervient dans des réactions métaboliques majeures, notamment le cycle de Krebs, la glycolyse, la  $\beta$ -oxydation des lipides et le métabolisme des AA. L'excès d'acétyl-CoA est exporté hors de la mitochondrie et diffuse jusqu'au noyau où il pourra être utilisé (Takahashi et al. 2006). En plus des apports alimentaires nécessaires à la production d'acétyl-CoA, certains composés de l'alimentation peuvent moduler l'activité des KATs et des HDACs, comme par exemple l'allyl mercaptane présent dans l'ail, le sulforaphane des brocolis, le butyrate ou l'hydroxybutyrate (produits de la  $\beta$ -oxydation des lipides et des AA) (**Figure 10**) (Delage et Dashwood 2008; Sleiman et al. 2016; Chriett et al. 2019).



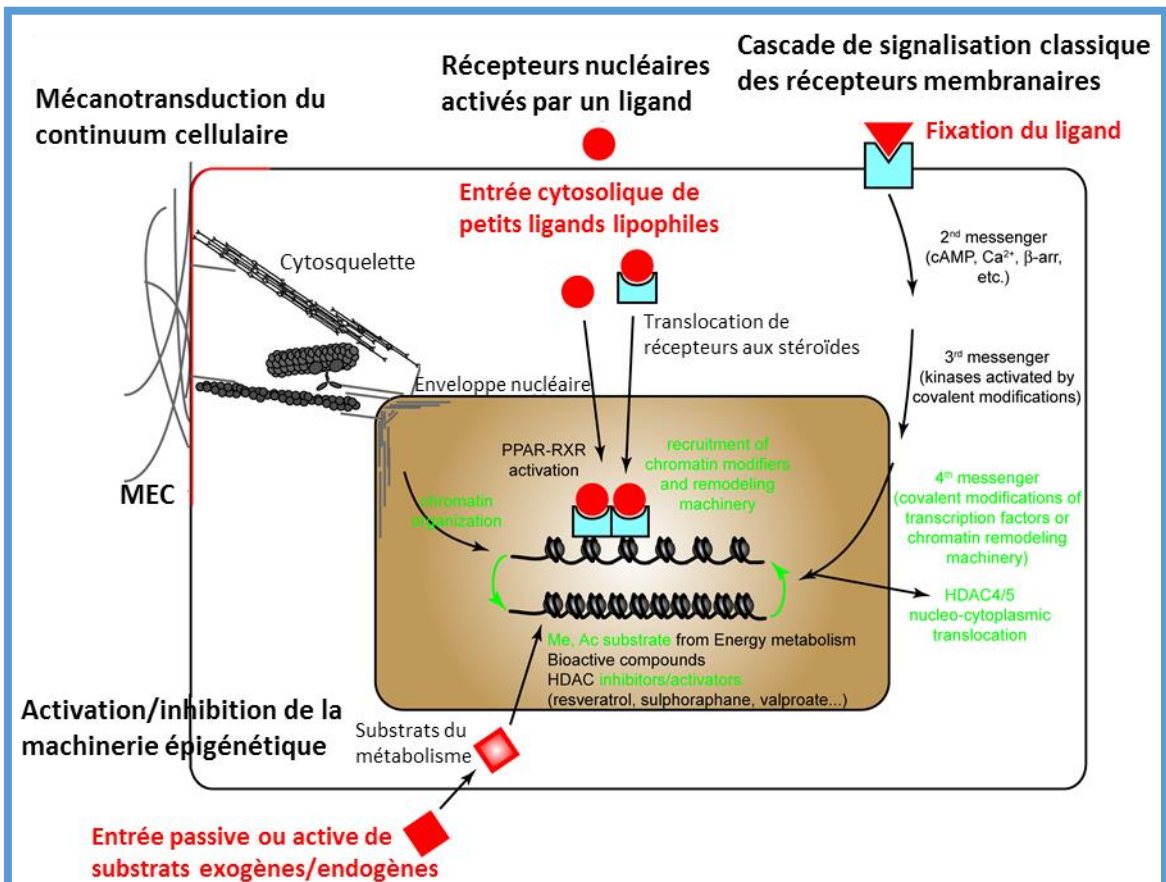


Figure 11. Mécanismes de transduction des signaux de l'environnement cellulaire

Il existe différents mécanismes par lesquels l'environnement peut agir sur l'organisation de la chromatine et la transcription. La fixation d'un ligand à son récepteur transmembranaire entraîne une cascade de signalisation aboutissant à des modifications de la conformation de la chromatine et de l'expression des gènes. Les récepteurs nucléaires sont activés par des ligands pouvant pénétrer dans la cellule. Cette activation entraîne leur translocation dans le noyau, permettant ainsi l'activation ou le recrutement d'acteurs de la machinerie épigénétique. Certains substrats du métabolisme peuvent pénétrer passivement ou activement dans la cellule et sont ensuite utilisés comme substrats des modifications épigénétiques. Certains de ces substrats peuvent aussi avoir une action activatrice ou inhibitrice sur les acteurs de la machinerie épigénétique. Le continuum cellulaire est assuré par des mécanismes de mécanotransduction, de la MEC jusqu'au noyau, et peuvent aboutir à des modifications de la chromatine.

MEC – matrice extracellulaire ; PPAR – récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes ; PPAR-RXR – récepteur X de l'acide rétinolique lié à PPAR

Adapté de Gabory A. under review

De nombreux effets environnementaux peuvent être médiés par une signalisation classique, telle que celle impliquant des récepteurs membranaires ou nucléaires. L'activation des récepteurs transmembranaires entraîne une cascade de signalisation aboutissant à des modifications de la transcription (Hellstrom et al. 2012). Dans le cytoplasme, la fixation de ligands aux récepteurs nucléaires, par exemple ceux de la famille PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), entraîne leur translocation nucléaire et le recrutement d'acteurs de la machinerie épigénétique, aboutissant à la modification de l'expression des gènes (Kishimoto et al. 2006; Gadaleta et Magnani 2014). Enfin, il existe un continuum entre l'environnement extracellulaire et la chromatine, assurée par des mécanismes de mécano-transduction, pouvant aboutir à des modifications de l'organisation de la chromatine (**Figure 11**) (Lelièvre 2009).

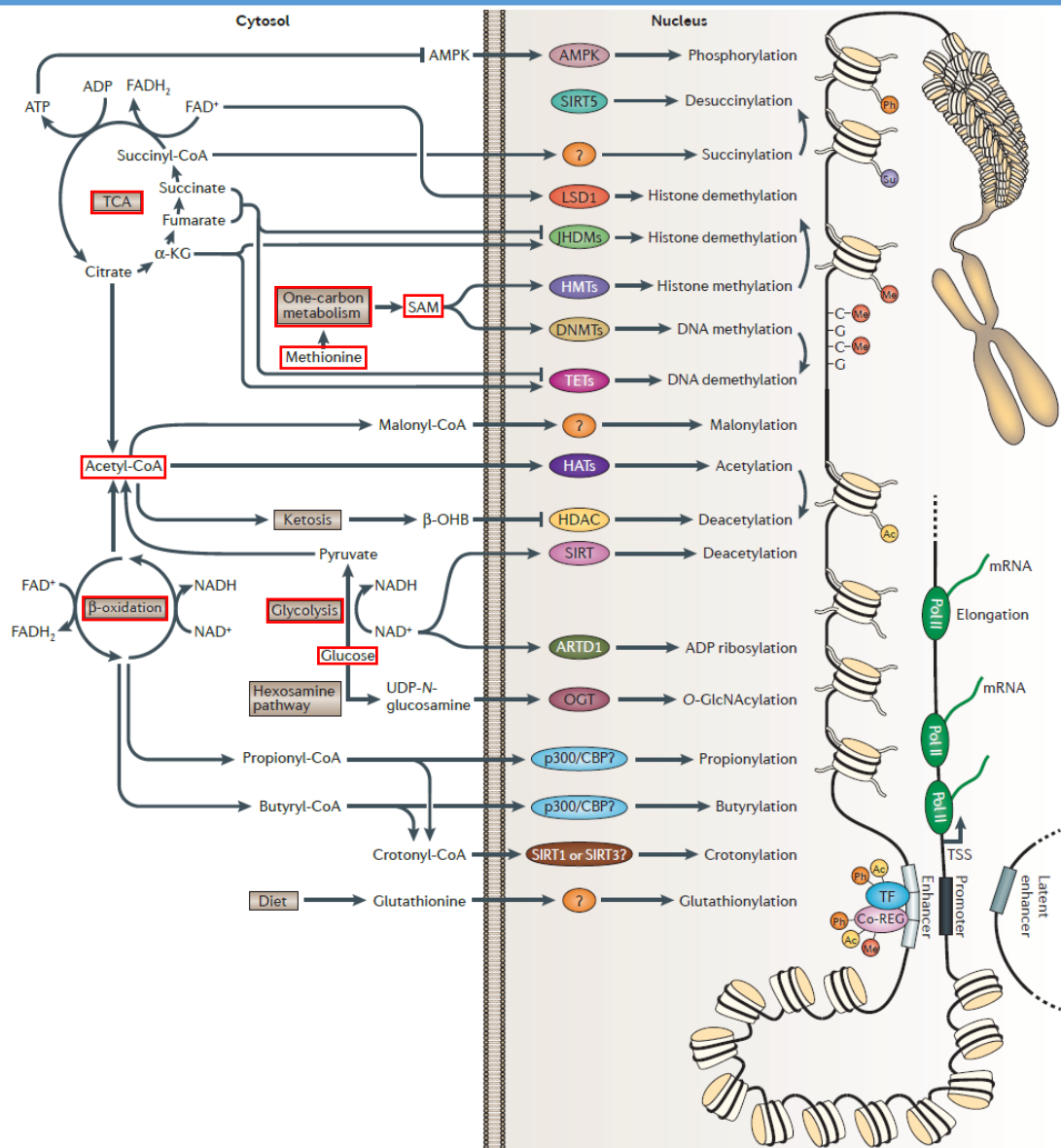
Le métabolisme et l'épigénétique apparaissent donc interdépendants (**Figure 12**). Ainsi, l'alimentation influence le métabolisme, l'environnement nutritionnel peut avoir un impact direct sur les processus épigénétiques (**Gabory A., under review**).

### **Epigénétique dans le contexte de la DOHaD**

D'après la littérature, trois fenêtres de vulnérabilité de l'épigénome à l'environnement se distinguent, pouvant conduire au développement de pathologies.

Tout d'abord la première fenêtre de vulnérabilité concerne la **gamétogenèse**, pendant laquelle se déroule un effacement de la méthylation de l'ADN et des marques activatrices ou répressives au niveau des histones. S'en suit une réapposition de ces marques afin de donner une identité gamétique à la cellule (Hackett et Surani 2012; Casas et Vavouri 2014). Dans un contexte d'obésité maternelle, des dommages à l'ADN ovocytaire, ainsi qu'un retard de croissance fœtale, ont été observés. Ces effets sont associés à une traduction insuffisante de la protéine Stella dans l'ovocyte. Cette protéine protège l'ADN de la déméthylation active, induite par la cascade des TETs. Cela conduit, dans l'embryon préimplantatoire, à une hypométhylation globale active du pro-noyau maternel, qui normalement subit une déméthylation passive (**Figure 13**) (L. Han et al. 2018).

Puis, juste **après la fécondation**, l'épigénome subit une restructuration complète : les histones remplacent les protamines présentes dans le pronucléus mâle, l'ADN est fortement déméthylé et les modifications post-traductionnelles des histones sont profondément



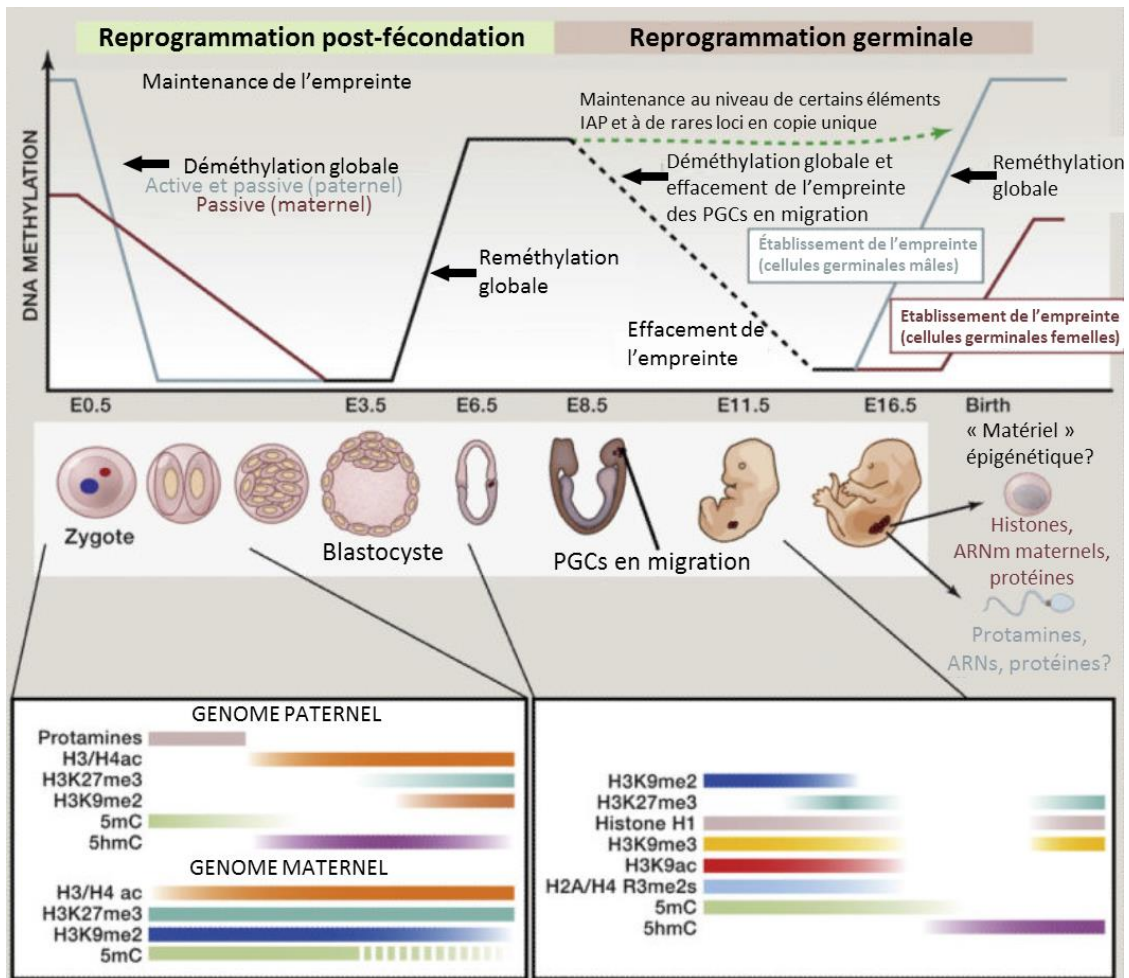
**Figure 12. Relations entre le métabolisme et la machinerie épigénétique**

Les métabolites des principales voies biochimiques participent à la régulation de la chromatine, entraînant des modifications de la régulation de la transcription. Le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et la β-oxydation fournissent de l'acétyl-CoA, substrat des HATs, utilisé pour l'acétylation des histones. La voie du métabolisme à 1 carbone fournit la S-adénosylméthionine (SAM), substrat de la méthylation de l'ADN et des histones. De nombreux autres métabolites participent à la régulation de la machinerie épigénétique. Par exemple, les niveaux d'AMP / ATP déterminent l'activité de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), qui phosphoryle les histones. L'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones constitue le « code histone », qui contrôlent l'accessibilité de la chromatine aux TF et par conséquent, la transcription. Sachant que l'alimentation influence le métabolisme, l'environnement nutritionnel peut avoir un impact direct sur les processus épigénétiques et l'expression des gènes.

α-KG – α-cétoglutarate ; β-OHB – hydroxybutyrate ; ARTD1 – ADP-ribosyltransférase analogue à la toxine diphtérique 1 ; co-REG – co-régulateur ; DNMT – ADN méthyltransférase ; GlcNAc – N-acétylglucosamine ; HDAC – histone désacétylase ; HMT – histone méthyltransférase ; JHDM – histone déméthylase contenant un domaine JmJc ; LSD1 – déméthylase 1 spécifique de la lysine ; OGT – N-acétylglucosamine transférase liée à l'oxygène ; p300 / CBP – p300 et protéine liant CREB ; Pol II – ARN polymérase II ; SIRT – sirtuine ; TF – facteur de transcription ; TET – méthylcytosine dioxygénase de translocation de dix à onze ; TSS – site de démarrage de la transcription

remodelées (**Figure 13**) (Heard et Martienssen 2014). Cette restructuration permet aux cellules d'avoir un profil d'expression totipotent, nécessaire au développement et à l'établissement de l'identité cellulaire. Durant le **développement préimplantatoire**, le statut métabolique maternel peut avoir des effets délétères. Peu d'études se sont intéressées aux effets d'une restriction alimentaire au cours de cette période périconceptionnelle (Fleming, Eckert, et Denisenko 2017). Aucune étude n'a étudié, à notre connaissance, les mécanismes épigénétiques sous-jacents. Nous pouvons supposer que l'obésité maternelle, ou du moins un régime HFD, au cours de la période préimplantatoire peut avoir des conséquences néfastes sur la santé de la descendance.

Enfin, suite à la gastrulation, un nouveau profil épigénétique est apposé au **stade fœtal**. La différenciation des tissus, l'organogenèse et la croissance fœtale se font alors sous le contrôle du placenta (Nelissen et al. 2011). Selon l'hypothèse de Barker, cette période est critique pour le développement à long terme de pathologies cardiovasculaires (D. J. Barker et al. 1989). Chez l'humain, les pathologies métaboliques maternelles qui sont associées à des défauts de croissance fœtale, sont aussi associées à des altérations de la méthylation de l'ADN dans le placenta (Ruchat et al. 2013). La plupart des études expérimentales concernant le stade fœtal ont été réalisées dans un contexte de sous-nutrition, ou de restriction protéique. Par exemple, une restriction alimentaire au cours de la période fœtale chez le rat entraîne un RCIU associé à une hypoinsulinémie ainsi qu'une dyslipidémie à l'âge adulte. Ces effets sont associés à une diminution de H3K14ac et une augmentation de H3K9me2 ainsi qu'à une augmentation de l'expression d'HDACs (HDAC 1 et 4) et d'une lysine méthyltransférase (KMT1a) (Raychaudhuri et al. 2008). Dans le cas d'un régime HFD au cours de la gestation chez la souris, le placenta est globalement hypométhylé, bien qu'une hyperméthylation soit détectée chez les fœtus femelles au niveau d'un dinucléotide CG (CpG) de la région de contrôle du gène soumis à empreinte *Igf2R* (Gallou-Kabani et al. 2010). Dans le même modèle murin, l'expression placentaire de 5 gènes de la machinerie épigénétique (*Dnmt3l*, *Kmt1a*, *Kmt1b*, *Prm7* et *Kdm5c*) est réduite en réponse au régime HFD maternel (Anne Gabory et al. 2012).



**Figure 13. Phases de reprogrammation de l'épigénome au cours du développement**

Chez la souris, il y a au moins deux phases de reprogrammation globale de la méthylation de l'ADN. La première a lieu juste après la fécondation et entraîne l'effacement des marques épigénétiques gamétiques. Au cours de cette phase, l'empreinte parentale est maintenue. L'autre phase de reprogrammation se déroule dans les cellules de la lignée germinale, dans lesquelles le programme somatique maternel et paternel est effacé. Suite à cela, l'empreinte parentale est apposée aux cellules de la lignée germinale. A chaque fenêtre de reprogrammation est associé un ensemble spécifique de mécanismes régulant l'effacement et la réapposition de la méthylation de l'ADN. L'effacement de la méthylation de l'ADN du zygote s'effectue de façon passive (pronoyau maternel) et active via l'action de la protéine TET3 (pronoyau paternel). Dans les cellules de la lignée germinale, ces processus sont encore mal compris.

IAP – particule intracisternale de type A ; PGCs – cellules germinales primordiales

Adapté de Heard et Martienssen 2014



### **3) Perte de poids préconceptionnelle et effets sur la santé de la descendance**

#### **3.1) Recommandations préconceptionnelles**

En raison des nombreux risques encourus par la mère et l'enfant en cas d'obésité maternelle, un suivi de grossesse est proposé aux femmes obèses dès le début de leur grossesse. La prise de poids gestationnelle est le premier paramètre à faire l'objet de recommandations de la part de l'*Institute Of Medicine*, en 1990. Ces recommandations ont eu pour but d'optimiser la croissance fœtale afin que le nouveau-né ait un poids optimal, soit entre 3 et 4 kg. Des études épidémiologiques de gain de poids gestationnel en fonction de l'IMC préconceptionnelle ont été utilisées afin d'établir ces recommandations (**Tableau 2**) (C. Y. W. Lee et Koren 2010).

L'effet des changements de mode de vie sur la prise de poids gestationnelle excessive, est assez limité. De plus, ils sont peu efficaces dans la prévention de la macrosomie chez l'enfant et dans la diminution du risque de diabète gestationnel ou de prééclampsie chez la mère (P. Catalano et deMouzon 2015). Il est par conséquent recommandé, aux femmes en surcharge pondérale, de perdre du poids avant la conception afin de normaliser la croissance fœtale et diminuer les risques de complications obstétriques, par l'amélioration de l'environnement métabolique maternel.

La Haute Autorité de Santé française a pour mission de définir les recommandations de santé publique et préconise (Haute Autorité de Santé 2011) :

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

Les professionnels de santé doivent expliquer aux femmes dont l'IMC est  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> qu'une perte de poids de 5 à 10% améliore la fertilité, la santé de la femme elle-même ainsi que celle de son futur enfant. Des conseils sont prodigués aux femmes en surpoids ou obèses afin qu'elles perdent du poids avant la grossesse et atteignent un IMC inférieur à 30 kg/m<sup>2</sup>, voire à 25 kg/m<sup>2</sup> dans l'idéal (Haute Autorité de Santé 2011). Cette assistance en amont de la grossesse est nécessaire dans certains pays, comme aux Etats-Unis où la moitié des grossesses

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

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

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

IMC – indice de masse corporelle.

Adapté de Haute Autorité de Santé 2011

ne sont pas planifiées et pour lesquelles 60 à 67% des femmes ont un poids gestationnel supérieur aux recommandations de l'IOM (C. Y. W. Lee et Koren 2010). En France, en revanche, la situation est moins dramatique car la plupart des grossesses sont planifiées et la proportion de femmes en surpoids ou obèse est plus faible qu'aux Etats-Unis (32% en France contre 60-67%) (ENP 2016). La stratégie principale d'amaigrissement consiste en l'association d'une alimentation saine et de la pratique d'une activité physique régulière. Il n'est cependant pas recommandé aux femmes enceintes de suivre un régime, car cela peut induire des carences nutritionnelles pour le fœtus (Haute Autorité de Santé 2011). Il est aussi possible d'effectuer une intervention chirurgicale préconceptionnelle en cas d'obésité morbide, au moins un an avant la grossesse selon les recommandations de la HAS (HAS 2009). Cependant, **les conséquences d'une perte de poids préconceptionnelle, quelle qu'en soit la modalité, sur la croissance fœtale et sur la santé à long terme de la descendance, sont insuffisamment décrites dans la littérature.**

### **3.2) Effets de la perte de poids préconceptionnelle maternelle sur la santé de la descendance**

Des travaux et méta-analyses récentes ont mis en évidence le rôle des trajectoires pondérales préconceptionnelles au cours du développement et leur impact sur la santé des descendants (Diouf et al. 2011; Tuersunjiang et al. 2013; Weisman et al. 2011; Zambrano et al. 2010; Rattanatrav et al. 2010; Price et al. 2018; Davis 2015; Adane et al. 2018). De manière intéressante, un faible gain de poids ou une perte de poids au cours de la grossesse diminue le risque de macrosomie (Bogaerts et al. 2015; Davis 2015). Une étude réalisée sur près de 1800 femmes, dans la cohorte française EDEN, s'est intéressée aux conséquences des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles sur le poids de naissance des enfants. Les auteurs ont comparé le poids des femmes à 20 ans et juste avant la grossesse. La perte de poids préconceptionnelle est associée à un risque de petit poids des enfants à la naissance chez les femmes sans surpoids ( $IMC \leq 25$ ). En revanche, chez les femmes en surpoids ou obèses ( $IMC \geq 25$ ) au début de leur grossesse, aucun effet du changement de poids préconceptionnel n'a été démontré sur le poids de naissance de leurs enfants (Diouf et al. 2011). Les trajectoires pondérales entre deux grossesses peuvent influencer la croissance fœtale à la seconde grossesse. Une perte d'au moins un point d'IMC diminue le risque de macrosomie à la seconde grossesse (Villamor et Cnattingius 2006).



Dans les études mentionnées plus haut, **les mécanismes sous-jacents aux effets des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles sur la croissance fœtale ne sont pas connus**. En effet, les causes exactes de la perte de poids des participantes (changement d'alimentation, activité physique régulière, maladies) ne sont pas documentées. Par la suite, je vous présenterai une revue des études qui se sont focalisées sur des interventions au niveau chirurgical, de l'activité physique ou nutritionnel chez des sujets obèses, chez l'homme puis dans des modèles animaux.

### **3.2.1) Chirurgie bariatrique**

En cas d'obésité sévère (IMC>35) et morbide (IMC>40) et lorsque les interventions au niveau du mode de vie n'ont pas eu de succès, la chirurgie bariatrique reste la seule option. Ce type d'opération restreint la capacité gastrique (chirurgie restrictive) ou bien l'absorption intestinale des aliments (chirurgie malabsorptive), ce qui diminue l'apport calorique. Les patients restent en surpoids, mais perdent tout de même environ 30% de leur poids de façon durable, ce qui réduit significativement la morbidité et les risques associés à l'obésité (Kjaer et Nilas 2013).

Selon trois revues systématiques récentes de la littérature, les risques de complications métaboliques (hypertension gestationnelle, diabète gestationnel, pré-éclampsie) sont moindres chez les patientes ayant eu recours à la chirurgie bariatrique (Kjaer et Nilas 2013; Kwong, Tomlinson, et Feig 2018; Al-Nimr et al. 2019). Ces revues aboutissent à des conclusions assez similaires quant aux effets de la perte de poids par intervention chirurgicale sur les descendants. Les mesures de poids et de taille à la naissance, corrigées par l'âge gestationnel, révèlent une diminution du poids de naissance, ainsi que des risques de macrosomie fœtale et post-natale. Les effets diffèrent légèrement selon l'opération chirurgicale effectuée, ils sont meilleurs en cas de chirurgie malabsorptive de type *by-pass* (Kwong, Tomlinson, et Feig 2018). Donc, dans l'ensemble, les interventions chirurgicales préconceptionnelles sont associées à une diminution de la proportion de nouveau-nés présentant un poids de naissance élevé. Ces revues ont aussi mis en lumière un risque accru de RCIU, ainsi que d'accouchements précoces. Elles s'accordent sur le fait que **des études sur des populations plus larges ou en ajustant les IMC maternels sont nécessaires pour une évaluation du rapport bénéfice/risque de la chirurgie bariatrique pour la descendance** (Kjaer et Nilas 2013; Kwong, Tomlinson, et Feig 2018; Al-Nimr et al. 2019).

Une comparaison a été réalisée chez des enfants de **2,5 à 25 ans**, nés avant ou après une opération de chirurgie bariatrique. La perte de poids maternel due à la chirurgie a permis de diminuer le nombre de macrosomes ainsi que le poids des descendants à la naissance. De plus, la comparaison entre des enfants nés après chirurgie et leurs frères et sœurs nés avant, révèle une diminution de la prévalence de l'obésité sévère (11% vs 35% respectivement) ainsi qu'une amélioration du profil métabolique (profil lipidique sanguin, sensibilité à l'insuline, pression artérielle) (Smith et al. 2009). Une étude plus récente n'a cependant pas été en mesure de montrer une amélioration des paramètres phénotypiques des descendants nés après chirurgie bariatrique restrictive comparé à leurs frères et sœurs nés auparavant. Selon les auteurs, cela pourrait être dû au type de chirurgie réalisé chez les mères, les interventions influant directement sur la régulation métabolique maternelle auraient un effet plus prononcé sur l'évolution du poids de la descendance (Willmer et al. 2013). Une étude antérieure montre une normalisation de l'IMC des descendants de mères ayant eu recours à une intervention de type *by-pass*. Cette normalisation laisse les auteurs supposer l'implication de mécanismes épigénétiques sous-jacents (Kral et al. 2006). Enfin, une altération du méthylome des cellules sanguines est observée chez les descendants de mères ayant eu recours à une chirurgie bariatrique malabsorptive, bien que les mécanismes précis de ce phénomène ne soient pas encore élucidés (Guenard et al. 2013).

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

### **3.2.2) Exercice physique**

L'exercice physique est l'une des stratégies non-invasives permettant de lutter contre l'obésité, en intervenant au niveau du mode de vie. Elle consiste en la pratique régulière d'activités physiques associées à un mode de vie actif. Une revue récente de la littérature a été réalisée sur l'effet de l'activité physique maternelle avant et/ou pendant la grossesse sur la santé des descendants (Tibana et al. 2017). Dans cette revue, 11 études réalisées chez le rat, la souris ou le porc ont été identifiées, avec des modalités d'activité physique différentes. Parmi elles, 3 ont été réalisées en association avec un régime maternel HFD de manière à causer une obésité, chez la souris ou le rat. Ces études montrent chacune **une amélioration dans les paramètres métaboliques des descendants mâles et femelles**, tels que la pression sanguine,

la tendance à l'hyperglycémie, l'obésité et les dyslipidémies. De manière intéressante, dans une de ces études, l'activité physique maternelle préconceptionnelle était associée à une diminution de l'hyperméthylation du promoteur du gène *Pgc1 $\alpha$*  et une augmentation de son expression au niveau musculaire (Laker et al. 2014). *PGC1 $\alpha$*  est un coactivateur important de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, glucidique et mitochondrial (Tiraby et Langin 2005).

Une perte de poids préconceptionnelle chez la souris peut être obtenue en les élevant dans un environnement favorable à l'activité physique, ou « enrichi » avec des jouets, des échelles, des roues, etc. et ce, dans des cages plus grandes. En condition de régime contrôle, des souris soumises à cet environnement, pendant les 4 semaines précédant la conception, ont perdu 17% de leur poids et amélioré leur profil métabolique comparées aux souris élevées dans des cages standards (Wei et al. 2015). Dans cette étude, **l'exercice en période préconceptionnelle à un effet considérable sur le phénotype des descendants mâles et femelles à l'âge adulte** : leur poids corporel, la prise alimentaire, l'adiposité, l'intolérance au glucose, l'insulinémie, la leptinémie, la cholestérolémie et la triglycéridémie sont diminués. De plus, une réduction d'expression de gènes de la voie de synthèse du cholestérol et de la lipogenèse, ainsi qu'une augmentation d'expression de gènes de la voie de la  $\beta$ -oxydation des lipides, ont été observées dans le foie de ces descendants. Ces modifications d'expression de gènes ont abouti à une diminution de l'accumulation hépatique de TG et de cholestérol. Des résultats similaires ont été obtenus en raccourcissant la durée d'exercice à 2 semaines. Cependant, la cholestérolémie, la triglycéridémie ou l'expression de certains gènes n'atteignent plus les mêmes niveaux que ceux observés après 4 semaines dans un environnement « enrichi » (Wei et al. 2015). La durée, mais aussi le type d'activité physique peut donc avoir une importance dans les effets bénéfiques observés chez la descendance. De manière intéressante, le profil métabolique de la descendance peut aussi être amélioré, au stade fœtal et à l'âge adulte, par de l'exercice ou une intervention nutritionnelle chez les pères obèses (Tibana et al. 2017; McPherson et al. 2013; McPherson et Lane 2015).

L'ensemble de ces résultats nous prouve que **l'activité physique en période préconceptionnelle, associée à une perte de poids, a un effet bénéfique non-négligeable sur la santé de la descendance à court et long terme**. La pratique d'une activité sportive est donc souhaitable pour les femmes obèses, le plus tôt possible en amont de la conception, afin d'optimiser les chances d'inversion de la programmation développementale de la descendance par l'obésité maternelle.

### 3.3.3) Intervention nutritionnelle

#### - Chez l'être humain

Une revue systématique de la littérature entre les années 2000 et 2012 récapitule les études portant sur la perte de poids maternelle préconceptionnelle par intervention nutritionnelle, chez des patientes obèses ou en surpoids (Forsum et al. 2013). La perte de poids préconceptionnelle a eu des effets positifs sur la mère : amélioration de la fertilité, réduction du risque de pré-éclampsie ou de diabète gestationnel. Néanmoins, selon cette revue, **aucune étude interventionnelle chez des patientes obèses ne rapporte les effets sur la descendance, à long terme, d'une perte de poids maternelle préconceptionnelle**. Il est par conséquent nécessaire de tester les effets d'une intervention nutritionnelle maternelle, chez la descendance à court et long terme (P. Catalano et deMouzon 2015; Forsum et al. 2013; Matusiak et al. 2014). Depuis cette revue, 2 articles présentant leur protocole d'étude à ce propos ont été publiés (LeBlanc et al. 2016; Price et al. 2018). Dans l'étude « Prepare » les participantes devront limiter leurs apports caloriques en étant suivies par un coach nutritionnel, tout en étant encouragée à pratiquer une activité sportive (LeBlanc et al. 2016). Dans l'étude prévue par Price et associés, les participantes seront assignées à une intervention nutritionnelle hypocalorique modérée ou bien importante (Price et al. 2018). Dans ces deux études, l'effet de la perte de poids maternelle préconceptionnelle sur la descendance sera évalué à la naissance uniquement sur des paramètres anthropométriques (taille et poids de naissance). Leurs résultats apporteront un éclairage nouveau à cette problématique, bien qu'une évaluation des paramètres métaboliques des descendants ainsi qu'un suivi à long terme soit encore à réaliser.

#### - Chez l'animal

Différents modèles animaux ont été utilisés afin d'étudier si les effets délétères de l'obésité maternelle préconceptionnelle sur le phénotype à long terme des descendants peuvent être corrigés par une intervention nutritionnelle préconceptionnelle.

**Chez le mouton**, un modèle d'intervention nutritionnelle préconceptionnelle a été réalisé. Les animaux ont été suralimentés (130% de l'apport recommandé) pendant les 4 mois précédant la gestation, initiée par insémination artificielle. Le groupe perte de poids a été généré par un retour à 100% de la quantité de nourriture recommandée pour les brebis, 4 semaines avant et après l'insémination. Les embryons ont ensuite été transférés à des brebis receveuses, non-obèses, maintenues sous régime 100% (S. Zhang et al. 2011). La perte de

poids a permis l'amélioration des paramètres métaboliques maternels, en particulier une diminution de la masse grasse. Chez la descendance, l'intervention nutritionnelle préconceptionnelle évite le développement d'une obésité au cours de la période post-natale, associée à une augmentation de la réponse au stress, du poids des glandes surrénales et à une diminution d'expression surrénalienne de l'*insulin-like growth factor 2 (Igf2)*. Ce gène est soumis à empreinte parentale, c'est-à-dire qu'il a une expression monoallélique, à partir de l'allèle paternel. Cette expression monoallélique est contrôlée par la présence d'un centre d'empreinte, qui est une région méthylée uniquement sur l'allèle paternel. De manière intéressante, la **diminution de la méthylation de l'ADN** constatée dans cette région entraîne la répression transcriptionnelle d'*Igf2* (S. Zhang et al. 2011). La période périconceptionnelle est donc une période importante dans la programmation métabolique de l'organisme et la mise en place de l'axe corticotrope (ou **HPA** pour hypothalamo-pituitary-adrenal), dont fait partie l'hypothalamus. De plus, **tous les effets de l'obésité maternelle préconceptionnelle ne sont pas atténués par l'intervention nutritionnelle dans ce modèle et la restriction calorique maternelle peut avoir eu chez la descendance un impact négatif sur le long terme.**

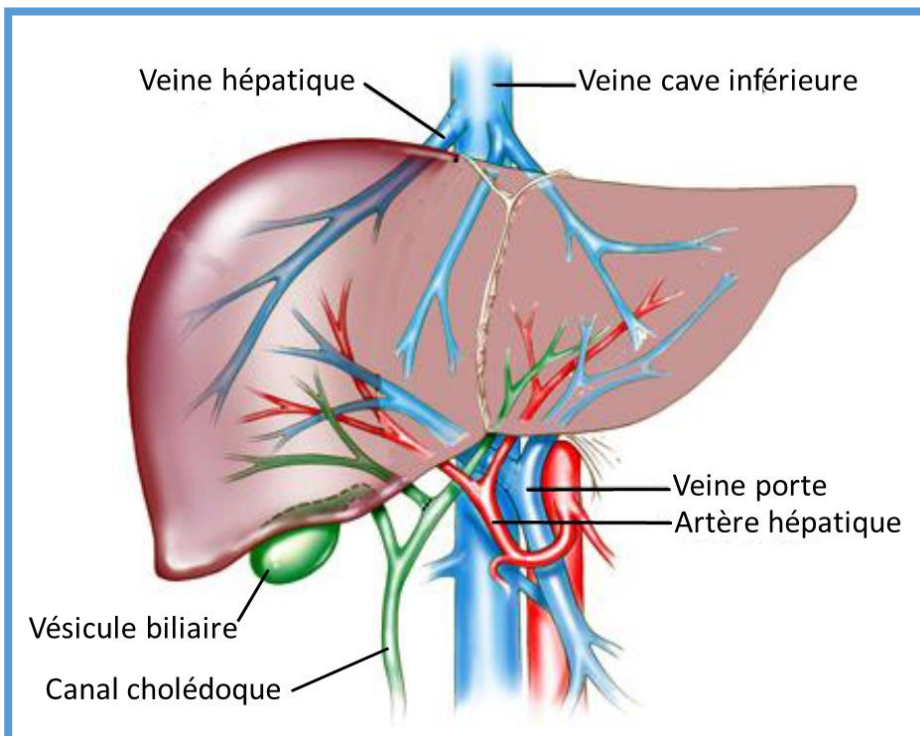
**Chez le macaque**, des femelles soumises à un régime HFD pendant 4 ans puis placées sous régime contrôle pendant 1 à 3 mois avant la gestation ne perdent pas de poids, leurs paramètres métaboliques sont néanmoins impactés. Ainsi, au stade fœtal, les descendants ont un poids corporel comparable à celui du groupe contrôle tandis que certains paramètres métaboliques sont positivement impactés : les niveaux plasmatiques de glycérol et TG retrouvent une valeur normale et sont associés à une réduction de 37% de l'accumulation de TG intra hépatiques comparé aux fœtus de mères HFD. De plus, l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogénèse, tels que *G6p*, *Fbp1* et *Pgc1α*, est partiellement normalisée, leur taux d'expression étant intermédiaires de ceux des descendants contrôles et HFD (McCurdy et al. 2009). Une seconde étude a été réalisée en soumettant des femelles à un régime WSD pendant 9 ans, puis en les plaçant sous régime contrôle 1 à 3 mois avant la gestation. Au stade fœtal, les descendants de mères n'ayant pas subi d'intervention nutritionnelle présentent une augmentation des TG intra hépatiques, du stress oxydatif et des niveaux d'expression de gènes lipogéniques. De plus, l'analyse métabolomique du phénotype métabolique hépatique de ces fœtus met en évidence une augmentation de la néoglucogénèse et du métabolisme des AA ainsi qu'une diminution d'intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique (**TCA**). Chez les descendants, ces altérations sont normalisées, excepté les TG intrahépatiques (Wesolowski et al. 2018). **Le retour à une alimentation équilibrée, même sans perte de poids maternelle, améliore donc le phénotype métabolique des mères et des**

**descendants, bien que les effets de l'obésité maternelle ne soient pas totalement normalisés.**

**Chez le rat**, l'obésité est induite par un régime hyperlipidique et la perte de poids par un retour à un régime contrôle, 1 mois avant l'accouplement. Cette intervention nutritionnelle permet chez la descendance, à court terme, une normalisation de la masse grasse, de l'insulinémie, de la leptinémie et de la triglycéridémie, malgré un poids maternel plus élevé que celui du groupe contrôle (Zambrano et al. 2010). A plus long terme, l'intervention nutritionnelle restaure la glycémie des descendants et diminue leur résistance à l'insuline, leur masse grasse et la taille des adipocytes. Une étude additionnelle a suivi le même protocole expérimental, mais en s'intéressant à des paramètres comportementaux chez les descendants mâles (Rodriguez et al. 2012). Dans cette étude, le régime HFD maternel altère les paramètres comportementaux des descendants (apprentissage, motivation, anxiété), tandis que l'intervention nutritionnelle normalise, voire améliore certains de ces paramètres chez les mères et les descendants. Les niveaux de corticostérone sont réduits à un niveau intermédiaire à celui des descendants contrôles et HFD, cependant, tous les descendants présentent des défauts d'apprentissage. Cet effet sur l'apprentissage peut être dû à l'exposition prénatale à un haut niveau de corticostérone, étant donné que l'exposition prénatale à des glucocorticoïdes change les fonctions de l'axe corticotrope ainsi que des récepteurs lui étant associés (Kapoor, Petropoulos, et Matthews 2008). **Toutefois, l'intervention préconceptionnelle permet notamment de restaurer les niveaux de motivation et de prévenir les comportements exploratoires aberrants observés chez les descendants de mères HFD** (Rodriguez et al. 2012).

Enfin, **chez la souris**, un modèle expérimental a testé l'effet d'une intervention nutritionnelle mise en place 2, 5 ou 9 semaines avant l'accouplement des futures mères. Seule l'intervention la plus longue (9 semaines) corrige l'effet du régime HFD maternel en normalisant les métabolismes glucidique et lipidique, via une re-sensibilisation à l'insuline ainsi qu'en rétablissant la signalisation Akt dans les adipocytes et AMPK dans le foie (H. Xu et al. 2018). De manière intéressante, dans leur précédent modèle d'intervention nutritionnelle réalisée 1 semaine avant l'accouplement, une aggravation de l'obésité et la déclaration précoce d'une sensibilité à l'insuline était détectée chez la descendance sous régime HFD (Fu et al. 2016). Cependant, dans ces modèles, les mères ne développent pas d'obésité et, étant donné que l'obésité maternelle et le régime HFD ont tous les deux un impact sur la santé de la descendance, il est nécessaire de les associer afin de mieux modéliser la situation observée chez l'être humain (S. Zhang et al. 2011).

La liste des modèles décrits ci-dessus est assez exhaustive, bien que lacunaire en ce qui concerne l'Homme, et atteste des effets d'une intervention nutritionnelle maternelle préconceptionnelle, au niveau du poids corporel et des fonctions d'organes majeurs dans le développement du syndrome métabolique (foie, pancréas, tissus adipeux, muscle). L'inversion des effets néfastes associés à l'obésité maternelle est observée chez les descendants au stade fœtal, et après la naissance, à court et long terme. **Cependant des zones d'ombre persistent, ce qui rend nécessaire le développement de nouveaux modèles, afin de comprendre les mécanismes des effets persistants de l'obésité maternelle et faire toute la lumière sur les effets de la perte de poids maternelle préconceptionnelle.**



**Figure 14. Circulation sanguine hépatique**

Représentation du foie, de la vésicule biliaire et des principaux vaisseaux sanguins hépatiques.

Adapté de la thèse de Polina Panchenko, 2015  
(<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01332747>)



# **Chapitre II : Fonctions hépatiques et impact des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles**

## **1) Morphologie, organisation et rôle central du foie à l'âge adulte**

### **1.1) Morphologie et organisation fonctionnelle à l'âge adulte**

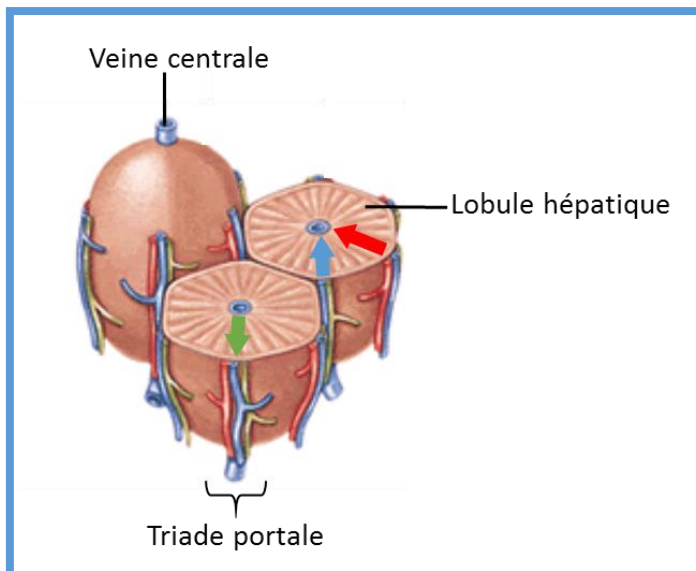
Le foie est le plus grand des organes viscéraux de l'organisme. Il est en charge de plusieurs processus physiologiques tels que le métabolisme des macronutriments, la régulation du volume sanguin, le contrôle de signaux endocrine et exocrine, le support du système immunitaire et la dégradation de xénobiotiques. Ces fonctions participent au maintien de l'homéostasie de l'organisme. L'apport de sang au foie est permis par l'artère hépatique et la veine porte. Ces vaisseaux convoient respectivement le sang oxygéné provenant des poumons et le sang riche en nutriment provenant des intestins. Le sang circule alors au travers du foie dans un plexus complexe de sinusoides avant de retourner vers le cœur en empruntant la veine cave (**Figure 14**). Le foie est composé de différents types cellulaires :

- Les hépatocytes représentent la majorité du volume hépatique à l'âge adulte et remplissent bon nombre des fonctions attribuées au foie, telles que la fonction métabolique, la détoxification et la sécrétion de la bile (stockée ensuite dans la vésicule biliaire) (Gentric et Desdouets 2014).

- Les cholangiocytes représentent le deuxième type cellulaire le plus abondant et forment la paroi luminale des canaux biliaires.

- Les cellules stellaires sont des cellules qui peuvent être présentes à l'état quiescent et stockent de la vitamine A dans des gouttelettes lipidiques. Elles contrôlent le dépôt et l'organisation du collagène dans le foie, ce qui peut évoluer sous forme de cirrhose et contribuer au déclin hépatique.

- Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie qui assurent une reconnaissance des éléments pathogènes acheminés jusqu'au foie. Les cellules de Kupffer peuvent jouer un rôle pro- ou anti-inflammatoire, en fonction de nombreux facteurs.



**Figure 15. Organisation du lobule hépatique**

Le lobule est organisé autour de la veine centrale vers laquelle se dirige le flux sanguin artériel (flèche rouge) et veineux (flèche bleue). La triade portale comprend les artères et veines hépatiques ainsi que le canal biliaire, vers lequel se dirige la bile produite par les hépatocytes (flèche verte).

Adapté de la thèse de Polina Panchenko, 2015  
(<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01332747>)

- Les cellules endothéliales sinusoidales du foie constituent une population spécialisée présentant des caractéristiques uniques. Elles sont essentielles aux échanges de protéines et de nutriments entre le sang et les cellules hépatiques (Trefts, Gannon, et Wasserman 2017).

L'unité fonctionnelle du foie est le **lobule** : celui-ci est composé d'hépatocytes et de capillaires sanguins autour desquels s'organisent des triades portales, constituées d'une veine porte, une veine hépatique et un canal biliaire (**Figure 15**). La composition du sang en nutriments, métabolites et oxygène est modifiée graduellement au fur et à mesure qu'il se dirige vers la veine centrale, au centre du lobule, par lequel il est évacué. Les hépatocytes ont des fonctions différentes selon leur emplacement dans le lobule. Cette « zonation métabolique » divise le lobule en trois zones distinctes dans lesquelles les hépatocytes ont des profils d'expression de gènes et de fonctions métaboliques différentes.

Cette architecture cellulaire complexe se construit progressivement au cours du développement et est nécessaire pour assurer de nombreuses fonctions. Ainsi, **des perturbations de la morphogenèse hépatique peuvent avoir à long terme des répercussions sur la santé**. Afin de mieux comprendre l'importance du foie, son rôle central à l'âge adulte est décrit ci-après.

## **1.2) Rôle central du foie pendant la vie adulte**

Au cours de la période post-natale, ainsi qu'à l'âge adulte, le foie est un organe clé du métabolisme lipidique, glucidique et protéique, et assure le maintien de l'homéostasie nutritionnelle et énergétique de l'organisme. Il possède des fonctions métaboliques qui impliquent la sécrétion d'une multitude de métabolites et de substances (glucose, lipoprotéines, protéines plasmatiques, mono/polypeptides) dans le sang. Le foie assure aussi une fonction sécrétoire essentielle, la production d'acides biliaires, indispensables à la digestion des lipides. Enfin, le foie assure l'élimination des déchets du métabolisme endogène tels que l'ammoniaque (produit de la dégradation protéique) sous forme d'urée, la bilirubine (produit de la dégradation de l'hème) ou encore les xénobiotiques (substances qui ne sont ni synthétisées par l'organisme, ni apportées naturellement par l'alimentation). Les hépatocytes ont une grande flexibilité dans leur choix de substrats énergétiques, le glucose et les acides gras étant les principaux. Cette sélection est régulée par les signaux hormonaux et par les nutriments eux-mêmes.

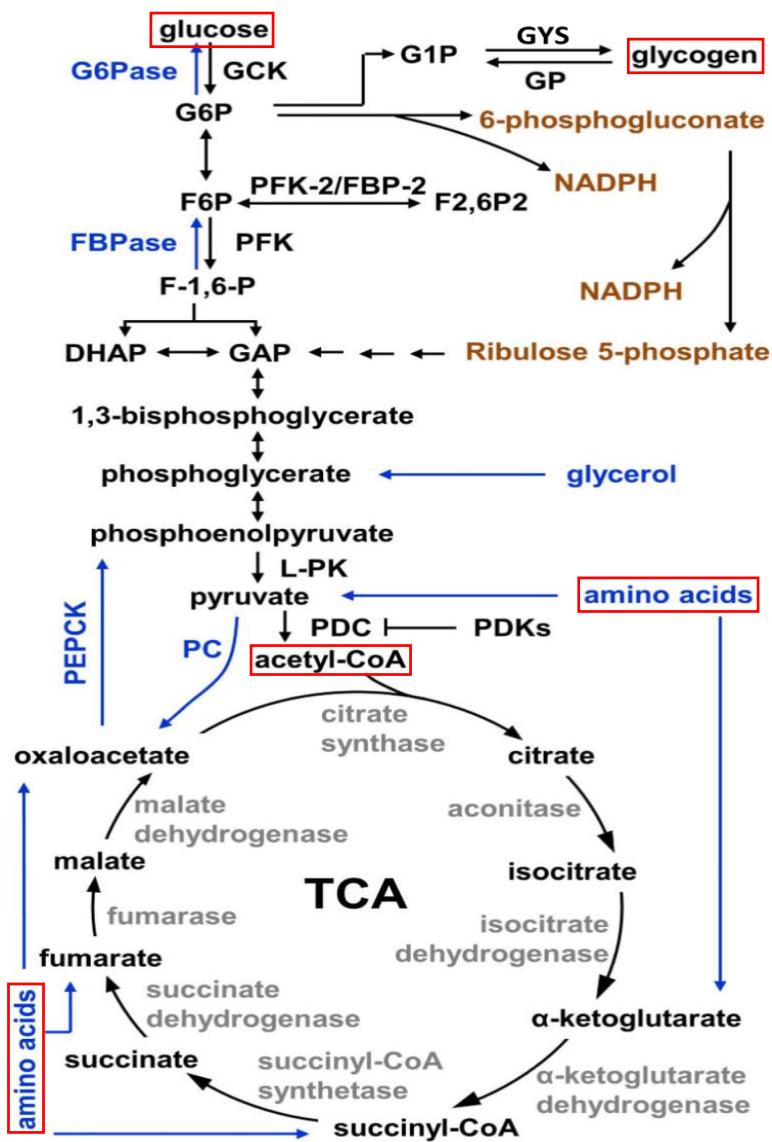


Figure 16. Représentation schématique de la voie du métabolisme du glucose

Les acteurs de la glycolyse sont indiqués en noir, les acteurs critiques de la néoglucogénèse sont indiqués en bleu et ceux de la voie des pentose-phosphate en orange.

GCK – glucokinase ; G6Pase – glucose-6-phosphatase ; G6P – glucose-6-phosphate ; G1P – glucose-1-phosphate ; GYS – glycogène synthase ; GP – glycogène phosphorylase ; F6P – fructose-6-phosphatase ; PFK – phosphofructokinase ; FBP/FBPase – fructose bisphosphatase ; DHAP – dihydroxyacétone phosphate ; GAP – glyceraldéhyde 3-phosphate ; L-PK – liver pyruvate kinase ; PC – pyruvate carboxylase ; PDC – complexe pyruvate déshydrogénase ; PDKs – pyruvate déshydrogénase kinases ; NADPH - nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné

Adapté de Rui, 2014

### 1.2.1) Métabolisme glucidique

Le glucose est le substrat énergétique fondamental de l'organisme et intervient dans la synthèse de biomolécules essentielles (ADN, ARN, protéines), la glycémie est par conséquent finement régulée. Le foie peut détecter le glucose circulant et assure son utilisation (la glycolyse), son stockage sous forme de glycogène (la glycogénogenèse) et sa production (la néoglucogenèse ou via la glycogénolyse). Il est le seul organe assurant des fonctions hypo et hyperglycémiantes. Cette particularité lui permet de libérer du glucose en cas de faible glycémie, par exemple dans un contexte de jeûne, mais aussi d'en stocker en cas d'hyperglycémie, par exemple en phase postprandiale (Oosterveer et Schoonjans 2014). Le glucose entre dans les hépatocytes via GLUT2, un transporteur membranaire. Le relargage du glucose est assuré par plusieurs transporteurs, dont GLUT1 et GLUT2. Le glucose intracellulaire est ensuite phosphorylé en glucose-6-phosphate (**G6P**) par la glucokinase, ce qui a pour effet d'augmenter l'entrée en glucose, tout en accumulant du G6P intracellulaire. En phase postprandiale, le G6P peut être utilisé comme précurseur de la synthèse du glycogène, il peut être métabolisé afin de produire du pyruvate par glycolyse ou du **NADPH** (nicotamide adénine dinucléotide phosphate) par la voie des pentoses-phosphate. Le pyruvate peut ensuite servir à la génération d'adénosine triphosphate (**ATP**) via le cycle de l'acide tricarboxylique (**cycle de Krebs**) mais aussi à la synthèse d'AG par lipogenèse. En état de jeûne, le G6P est déphosphorylé dans le réticulum endoplasmique afin de permettre le relargage du glucose.

#### Glycolyse

Dans un état nourri, le glucose est abondant et la glycolyse est la voie métabolique dominante. Les intermédiaires et les produits de la glycolyse peuvent être utilisés afin de synthétiser une grande diversité de molécules dont les lipides, les acides nucléiques et l'ATP.

Les flux glycolytiques sont contrôlés principalement par quatre kinases : la glucokinase (**GCK**), la 6-phosphofructo-1 kinase (**PFK**), la liver pyruvate kinase (**L-PK**) et les pyruvate déshydrogénase kinases (**PDKs**) (**Figure 16**). L'activité de ces enzymes est basse en période de jeûne et augmente en phase postprandiale (D. H. Kim et al. 2011). En phase postprandiale, le glucose active **ChREBP** (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) qui se fixe au motif E-box du promoteur du gène de la L-PK, ce qui active l'expression de cette dernière dans les hépatocytes. L'insuline participe à la régulation de la glycolyse en ayant une action antagoniste à celle du glucose : elle supprime l'expression de PDK4 par

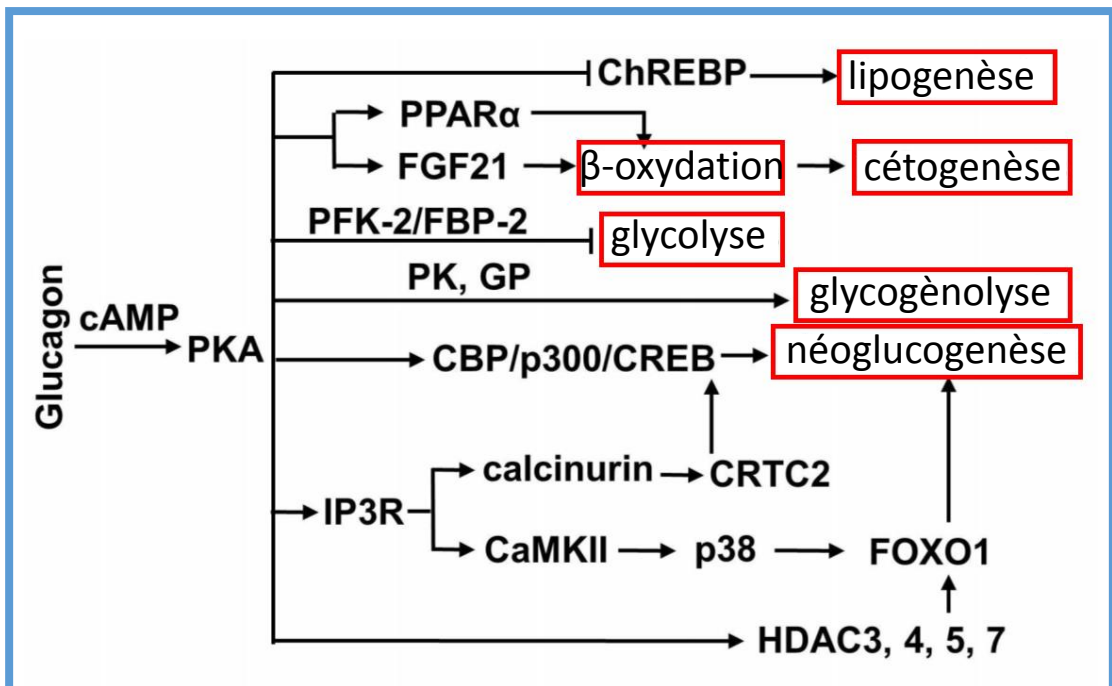


Figure 17. Régulation du métabolisme glucidique et lipidique par le glucagon

ChREBP - carbohydrate-responsive element-binding protein ; PPAR - peroxisome proliferator-activated receptor ; FGF - fibroblast growth factor ; PFK - phosphofruktokinase ; FBP - fructose bisphosphatase ; PK - pyruvate kinase ; GP - glycogène phosphorylase ; CBP - CREB binding-protein ; CREB - C-AMP response element-binding protein ; IP3R - inositol trisphosphate receptor ; CaMKII - Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II ; CRTC - CREB regulated transcription coactivator 2 ; FOXO - Forkhead box O ; HDAC - histone désacétylase

Adapté de Rui, 2014

l'inhibition de **FOXO1** (*forkhead box O1*), ce qui accroît la consommation de pyruvate, la production d'acétyl-CoA et la glycolyse (Jeong et al. 2012). En période de jeûne, les niveaux de glucose sont habituellement bas, les hépatocytes utilisent alors la  **$\beta$ -oxydation** des AG afin d'assurer les apports énergétiques. Cet équilibre entre sensibilité au glucose et à l'insuline permet une régulation fine du métabolisme glucidique hépatique et par conséquent, celle de la glycémie.

### **Glycogénogenèse / Glycogénolyse**

Le glycogène est un glucide complexe, polymère du glucose, pouvant servir au stockage ou à la production (déstockage) de glucose au niveau hépatique. Son métabolisme permet une régulation dynamique de la glycémie.

Le G6P est un précurseur et un activateur de la synthèse de glycogène, assurée par la glycogène synthase (**GYS**). Il est aussi un inhibiteur de la glycogène phosphorylase (**GP**), une enzyme responsable de la glycogénolyse (Agius 2008). L'activité de la GYS et celle de la GP sont régulées par des modifications post-traductionnelles, principalement la phosphorylation. L'insuline est un facteur important de cette régulation. Sa production, suite à un apport alimentaire, stimule la GYS via l'activation de la cascade de phosphorylation AKT, mais aussi, inhibe la GP en stimulant son acétylation. De plus, l'insuline stimule l'expression de la GCK, ce qui accroît indirectement l'absorption de glucose par les hépatocytes.

En état de jeûne, la sécrétion de l'insuline est diminuée, ce qui entraîne une inhibition de la GYS et une activation de la GP (T. Zhang et al. 2012). De plus, du glucagon et des catécholamines sont produits en phase de jeûne, et ont une action opposée à celle de l'insuline ou du G6P (Agius 2008). Une fois fixées à leurs récepteurs, ces hormones entraînent une activation de la GP grâce à une phosphorylation directe ou indirecte de cette dernière. Le glucagon inhibe également l'acétylation de la GP et favorise donc ainsi son activité (**Figure 17**) (Agius 2008; Rui 2014).

### **Néoglucogenèse**

Durant les périodes courtes de jeûne, le foie produit et procède au relargage du glucose principalement par glycogénolyse. En période de jeûne prolongée, les réserves en glycogène s'épuisent, le foie synthétise alors du glucose via la néoglucogenèse en utilisant différents substrats tels que le lactate, le pyruvate, le glycérol et les acides aminés (**Figure 16**). Ces substrats sont produits dans le foie ou proviennent des tissus extra hépatiques via la circulation sanguine.

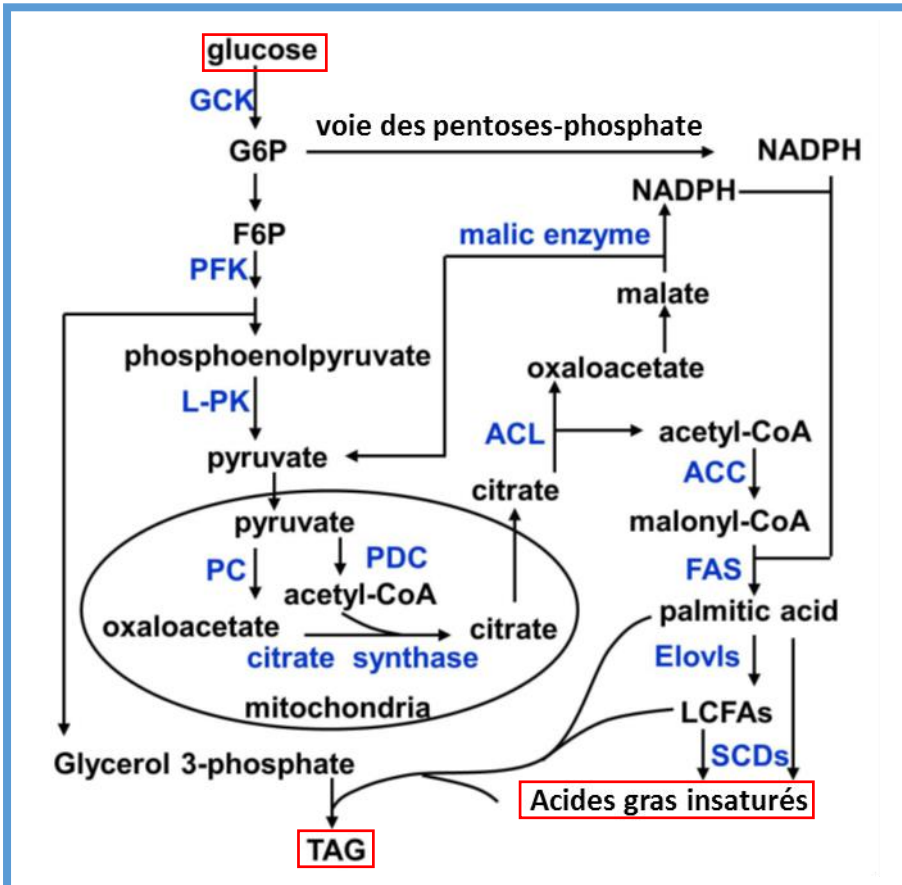


Figure 18. Voies de la lipogénèse

Les enzymes lipogéniques sont écrites en bleu.

GCK – glucokinase ; G6P – glucose-6-phosphate ; F6P – fructose-6-phosphate ; PFK – phosphofruktokinase ; L-PK – liver pyruvate kinase ; PC – pyruvate carboxylase ; PDC – complexe pyruvate déshydrogénée ; NADPH - Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogénée ; ACL – ATP citrate lyase ; ACC – acétyl-CoA carboxylase ; FAS – fatty acid synthase (AG synthase) ; Elovs – AG-CoA synthase ; LCFA – AG à longue chaîne ; SCDs – stéaroyl-CoA désaturases ; TAG – triacylglycérol

Adapté de Rui, 2014



Le **lactate** est oxydé en pyruvate, qui est utilisé afin de produire de l'oxaloacétate. La phosphoénolpyruvate carboxylase catalyse ensuite la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate, étape clé de la néoglucogenèse. Puis, plusieurs réactions enzymatiques successives aboutissent à la génération de fructose 1,6-biphosphate, qui est ensuite déphosphorylé par la fructose biphosphatase (**FBPase**) pour générer du fructose-6-phosphate (**F6P**). La production de glucose est ensuite assurée par la conversion du F6P en G6P et enfin par la déphosphorylation de ce dernier par la G6Pase. Cette dernière étape est limitante pour la néoglucogenèse (Rui 2014).

Le **glycérol** pénètre dans les hépatocytes puis est phosphorylé par la glycérol-kinase pour générer du glycérate-3-phosphate, un précurseur de la néoglucogenèse (Jelen et al. 2012).

Les **acides aminés** sont désaminés en  $\alpha$ -cétoacides par des réactions catalysées par la glutaminase, la glutamate déshydrogénase et/ou des aminotransférases. Ces  $\alpha$ -cétoacides sont par la suite convertis en intermédiaires du cycle de Krebs, servant de précurseurs à la néoglucogenèse (C. McC. Brooks 1988; Rui 2014).

### 1.2.2) Métabolisme lipidique

Lorsque les glucides sont abondants, le foie utilise le glucose comme substrat énergétique principal et métabolise en partie le surplus en AG, via les voies lipogéniques. Des AG peuvent aussi être apportés au foie via la circulation sanguine, en provenance du tissu adipeux ou par la digestion et l'absorption des aliments au niveau du tractus gastro-intestinal. Le foie est le principal organe convertissant les glucides en AG. Dans le cytoplasme, l'acétyl-CoA est utilisé par l'acétyl-CoA carboxylase pour former du malonyl-CoA. L'acide gras synthase utilise conjointement le malonyl-CoA et le NADPH comme précurseurs à la synthèse d'acide palmitique, précurseur de la synthèse d'acides gras à chaîne longue, qui peuvent être mono ou polyinsaturés après action de la stéaroyl-CoA désaturase (**Figure 18**) (Spencer, Corman, et Lowenstein 1964; Nguyen et al. 2008; Rui 2014; Trefts, Gannon, et Wasserman 2017).

En phase de jeûne, les AG sont utilisés afin de générer des substrats énergétiques internes via les voies oxydatives, ou externe par la production de corps cétoniques, ce qui participe de plus à éviter le stress oxydant lié au cycle de Krebs. Après un repas, les AG alimentaires sont utilisés pour produire des TG au niveau des entérocytes intestinaux, qui sont ensuite sécrétés dans le système lymphatique et la circulation sanguine sous forme de

chylomicrons (Nechles 1952). Après absorption hépatique, les chylomicrons relarguent des AG non estérifiés via la **lipolyse**, principalement contrôlée par des **lipoprotéines lipases**. Les AG sont ensuite de nouveau convertis en TG ou en esters de cholestérol, lesquels sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ou sécrétés dans la circulation sanguine sous forme de **VLDL** (lipoprotéine de très basse densité ou, en anglais, *very low density lipoprotein*), pour être apportés aux tissus extra-hépatiques. Les AG sont aussi incorporés au sein de phospholipides, des composants essentiels aux membranes cellulaires (Ontko et Zilvermit 1967; Chao, Stiers, et Ontko 1986; Rui 2014; Trefts, Gannon, et Wasserman 2017).

Le métabolisme lipidique hépatique permet donc la mise à disposition de substrats lipidiques pour tout l'organisme. Il est donc essentiel à l'absorption de vitamines liposolubles et à l'homéostasie du cholestérol via la possibilité de synthèse d'acides gras *de novo*. Un déséquilibre dans l'homéostasie du cholestérol peut avoir des conséquences pathologiques. Un excès en AG de manière générale va entraîner une accumulation de lipides dans les hépatocytes, une caractéristique de la stéatose hépatique (Purushotham et al. 2009).

### 1.2.3) Métabolisme protéique

La synthèse et la dégradation des protéines est critique pour assurer les fonctions au niveau cellulaire mais aussi de l'organisme dans son ensemble. Le foie est l'organe principal de la synthèse protéique, il est responsable de 85 à 90% du volume total des protéines circulantes, principalement de l'albumine qui est essentielle au maintien de la volémie sanguine et au transport de différentes molécules telles que des hormones ou des lipides (Miller et al. 1951). Le foie sécrète de plus des facteurs de croissance ainsi que plusieurs autres facteurs de régulation systémique. Le glycogène et les protéines sont dégradées dans le tissu musculaire, qui relargue principalement du lactate et de l'alanine. Le foie a une grande capacité pour métaboliser les **AA** produits par cette dégradation protéique. L'alanine, le lactate et le glycérol sont délivrés au foie par la circulation sanguine et utilisés comme précurseurs de la néoglucogenèse (**Figure 16**) (G. A. Brooks 1987; Rui 2014; Trefts, Gannon, et Wasserman 2017). Le foie peut aussi dégrader lui-même des protéines afin d'obtenir des AA disponibles pour la néoglucogenèse. Cette synthèse du glucose nécessite l'implication du cycle de l'urée afin d'éviter les effets cytotoxiques des déchets azotés. Cette utilisation des AA participe à l'homéostasie du glucose en cas de jeûne prolongé et assure un apport

énergétique aux tissus extra-hépatiques (G. A. Brooks 1987; Rui 2014; Trefts, Gannon, et Wasserman 2017).

#### 1.2.4 Contrôles du métabolisme énergétique

Une multitude de facteurs interviennent dans le contrôle du métabolisme énergétique au niveau hépatique.

Le statut métabolique de l'organisme va orienter les voies de production d'énergie ou de stockage. Par exemple, en cas de faible statut énergétique, comme pendant une période de jeûne, les membres des familles SIRT et **AMPK** (pour *adenosine monophosphate (AMP) activated protein kinase* en anglais) sont activés tandis qu'en état de haut statut énergétique, **mTORC1** (pour *mammalian target of rapamycin complex 1* en anglais) est activé. SIRT, AMPK et mTORC1 sont considérés comme des senseurs moléculaires du statut énergétique. Plusieurs facteurs régulateurs de la transcription de la voie de la néoglucogénèse sont des substrats de ces trois senseurs. L'activation de Sirt et AmpK va entraîner l'activation de la néoglucogénèse mais aussi une inhibition de la lipogénèse (Rui 2014). Les cycles circadiens sont aussi une composante importante de la régulation du métabolisme énergétique. La néoglucogénèse est inhibée via l'action inhibitrice des protéines chryptochrome (Cry1/2) sur le récepteur aux glucocorticoïdes ainsi que sur les récepteurs au glucagon (Lamia et al. 2011; E. E. Zhang et al. 2010). Quant à la lipogénèse hépatique, elle est régulée, par exemple, par le recrutement génomique rythmique d'Hdac3. La délétion d'*Hdac3* entraîne une augmentation d'expression de gènes lipogéniques, entraînant le développement d'une stéatose hépatique chez la souris (Knutson et al. 2008). La biodisponibilité en glucose et en glucides, en particulier le pyruvate, va aussi influencer le métabolisme énergétique. En période postprandiale, le glucose et le pyruvate sont abondants, la glycolyse et la lipogénèse sont donc dominantes. En revanche, en phase de jeûne, les hépatocytes utilisent la voie de la  $\beta$ -oxydation des AG pour produire de l'énergie. Le pyruvate est un composé important dans la régulation du métabolisme énergétique et permet le lien entre glycolyse et lipogénèse (Rui 2014).

Plusieurs hormones participent au contrôle du métabolisme énergétique, l'insuline par exemple, influence le métabolisme glucidique et lipidique. Son action passe par l'activation de régulateurs de la transcription, par exemple les protéines de la famille Foxo, qui inhibent la néoglucogénèse ou encore par la stimulation de l'expression de **Srebp-1** (pour *sterol regulatory element-binding protein 1* en anglais), activant la lipogénèse. De plus son action

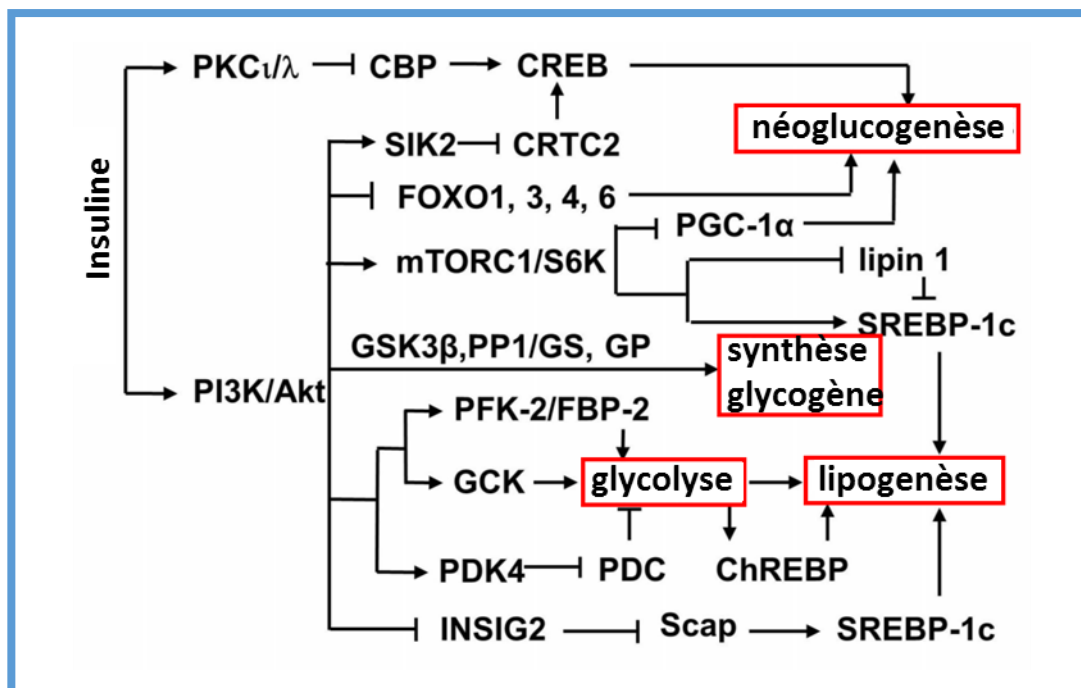


Figure 19. Régulation du métabolisme glucidique et lipidique par l'insuline

PKC – protéine kinase C ; CBP – CREB binding-protein ; CREB - C-AMP response element-binding protein ; CRTC2 - CREB regulated transcription coactivator 2 ; SIK2 – sérine/thréonine protéine kinase 2 ; FOXO – Forkhead box O ; PGC - peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator ; mTORC - mammalian target of rapamycin complex ; SREBP - sterol regulatory element-binding proteins ; PI3K/Akt - phosphatidylinositol-3-kinase/Akt ; GSK – glycogène synthase kinase ; PP1/GS – protéine phosphatase-1 / glycogène synthase ; GP – glycogène phosphorylase ; PFK – phosphofructokinase ; FBP – fructose bisphosphatase ; GSK - glucokinase ; PDK4 - pyruvate déshydrogénase kinase isozyne 4 ; PDC – complexe pyruvate déshydrogénase ; ChREBP - carbohydrate-responsive element-binding protein ; INSIG2 - insulin induced gene 2 ; Scap - SREBP cleavage-activating protein

Adapté de Rui, 2014

stimule la glycolyse, ce qui augmente la disponibilité en précurseurs lipogéniques (**Figure 19**) (Rui 2014). Les cytokines sont elles aussi d'importants facteurs régulateurs : en réponse à la signalisation de l'insuline dans l'hypothalamus, les cellules immunitaires hépatiques sécrètent des interleukines, ce qui entraîne un arrêt de la néogluogénèse, via l'activation de **Stat3** (pour *signal transducer and activator of transcription 3* en anglais) (Inoue et al. 2006). D'autres facteurs entrent en jeu dans la régulation du métabolisme énergétique : des facteurs et co-régulateurs de la transcription, des récepteurs membranaires et nucléaires, mais aussi le stress du réticulum endoplasmique (Rui 2014).

Les voies du métabolisme glucidique, lipidique et protéique sont finement régulées et interagissent dans le foie. De plus, le foie entretient un dialogue constant avec les autres tissus de l'organisme, en particulier les muscles squelettiques, le tractus gastro-intestinal, le cerveau et le tissu adipeux. Un environnement nutritionnel ou un statut métabolique délétère (i.e. obésité) peuvent donc avoir des effets néfastes sur les fonctions essentielles assurées par le foie et sur l'organisme en général.

### **1.3) Physiopathologie hépatique en contexte d'obésité**

#### **1.3.1) Stéatose hépatique non alcoolique**

L'obésité et ses comorbidités sont associées à des pathologies du foie telles que la NAFLD et la stéatohépatite non alcoolique (*non-alcoholic steatohepatitis*, **NASH**). La stéatose hépatique se caractérise par une accumulation excessive de TG et d'AG dans les hépatocytes. En absence d'intervention, la NAFLD peut progresser en NASH, caractérisée par une inflammation et par la destruction des hépatocytes, ce qui peut entraîner le développement de fibrose. La fibrose peut évoluer et entraîner une cirrhose puis un hépatocarcinome. Les NAFLD et NASH sont des maladies potentiellement mortelles dont la prévalence a doublé au cours des vingt dernières années (World Gastroenterology Organisation 2012; Milić, Lulić, et Štimac 2014).

#### **1.3.2) Etiologie de la stéatose hépatique**

La stéatose hépatique est une maladie multifactorielle : l'âge, l'obésité, le syndrome métabolique, la sédentarité sont des facteurs de risque. La cause principale de cette maladie

est un dérèglement du métabolisme glucidique et lipidique hépatique. La résistance à l'insuline, l'action des cytokines et du stress oxydant sont des éléments clés de la pathogenèse (World Gastroenterology Organisation 2012).

Différents mécanismes peuvent expliquer l'accumulation de lipides dans le foie (Milić, Lulić, et Štimac 2014) :

- augmentation de l'absorption des lipides alimentaire ou des AG relargués dans la circulation sanguine après lipolyse dans le TAB ;
- augmentation de la lipogenèse *de novo* dans le foie ;
- diminution de la  $\beta$ -oxydation des AG ;
- diminution de la sécrétion de TG produits par le foie.

Les avancées dans les techniques de chimie analytique permettent d'évaluer l'impact de la NAFLD au niveau du métabolome. Des souris développant spontanément une NAFLD présentent une augmentation des TG, diglycérides, AG, céramides et AG oxydés hépatiques. Ce schéma est aussi présent dans le sérum de ces souris et concorde avec le métabolome du sérum de patients humains atteints de NAFLD (Alonso et al. 2017). Un régime HFD enrichi en cholestérol et acide cholique (présent dans la bile) suffit au développement d'une NAFLD/NASH, sans obésité. Les souris soumises à ce régime présentent une augmentation du cholestérol et des acides biliaires hépatiques mais aussi une altération des profils d'acides gras libres (ou *FFA* pour *free fatty acids* en anglais), DG et TG, de phospholipides membranaires ainsi que de métabolites impliqués dans le métabolisme du glucose ou du TCA (Tu et al. 2017). Une NAFLD causée par un régime HFD ou accompagnée de diabète par traitement à la streptozocine et une NASH causée par un régime déficient en méthionine et choline ont été expérimentées chez la souris. Leur métabolome hépatique présente des altérations dans plusieurs voies métaboliques liées aux lipides, aux AA ou à l'autophagie (X.-L. Liu et al. 2017).

### **1.3.3) Mécanismes épigénétiques impliqués dans la stéatose hépatique**

Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes épigénétiques sont impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Par conséquent, ils peuvent également contribuer à la pathogenèse de la NAFLD. La méthylation de l'ADN au niveau de gènes du métabolisme 1C (*MATD2*, *AHCY* et *MAT1A*) est modifiée en contexte de stéatose hépatique et

peut être impliquée dans la mise en place et la progression de la pathologie (Jooho Lee et al. 2017; Eslam, Valenti, et Romeo 2018). La biodisponibilité des donneurs de méthyle tels que la méthionine, la choline ou le folate, peut influencer directement sur la bioconversion de la SAM. Cela entraîne une dérégulation du métabolisme de la choline, aboutissant à une accumulation de TG dans le foie (Chew et al. 2011). En contexte de NAFLD chez l'humain, l'ADN au niveau de gènes du métabolisme à un carbone est hyperméthylé et l'expression de ces gènes est réduite. De plus, une hypométhylation est constatée au niveau de gènes de réparation tissulaire, associée à une surexpression de ces derniers (Murphy et al. 2013). **Pgc-1 $\alpha$**  (ou Ppargc-1 $\alpha$  pour **PPAR** (pour *peroxisome proliferator-activated receptors* ou récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes) *gamma coactivator-1 $\alpha$* ) est un gène majeur de la régulation du métabolisme hépatique dont le promoteur est hyperméthylé chez la souris et l'être humain. De plus le niveau de méthylation de ce gène est associé à l'insulinémie à jeun chez l'être humain (Sookoian et Pirola 2013; Pruis et al. 2014).

Les modifications post-traductionnelles des histones sont aussi impliquées dans les mécanismes de la stéatose hépatique. *In vitro*, l'exposition d'hépatocytes à des lipides induit une stéatose associée à une surexpression des lysines déméthylases **Kdm3b**, **Kdm5b** et **Kdm5c**. Leurs cibles, H3K4 et H3K9, voient leur profil en triméthylation augmenter ou diminuer au niveau de promoteurs de 16 gènes du catabolisme lipidique (Jun et al. 2012). Chez la souris C57BL/6J, la susceptibilité à développer une NASH est associée à l'hypométhylation de H4K20me<sub>3</sub>, à une diminution de l'expression de *Dnmt1* et *Prdm2* (aussi connue en tant que *Riz1*, la protéine PRDM2 est une lysine méthyltransférase) et à une augmentation de l'expression de *Dnmt3a* (Pogribny et al. 2009).

L'acétylation des histones, contrôlée par la balance entre KATs et HDACs ou SIRTs, est aussi impliquée dans la stéatose hépatique. La surexpression de la lysine acétyltransférase **Kat3b** (*p300*) augmente le niveau de H3K9ac dans la région promotrice du gène codant pour la L-pk. Cela favorise le développement de la stéatose hépatique, de l'insulino-résistance et de l'intolérance au glucose, associé à une surexpression de gènes impliqués dans la lipogenèse et la glucogenèse (Bricambert et al. 2010). Chez la souris, Hdac3 agit dans le foie selon un rythme circadien et régule l'expression de gènes de l'homéostasie lipidique. Une alimentation hypercalorique ou un manque de sommeil entraîne la perturbation de ce rythme, ce qui peut entraîner le développement d'une stéatose hépatique, une résistance à l'insuline et une obésité (Mazzocoli 2014; Feng et al. 2011). L'acétylation des histones et de protéines non-histones accroît le profil d'expression de gènes lipolytiques, induisant ainsi le développement de NAFLD (Tian et al. 2013). Les Sirts et leur cofacteur, le NAD<sup>+</sup>, contrôlent des réactions de

désacétylation ciblant des histones et des protéines non-histones. Ces dernières sont associées aux réponses adaptatives au stress métabolique par leur régulation de l'homéostasie lipidique et de la sécrétion d'insuline (Joo Lee, Friso, et Choi 2014). De plus, la diminution de l'expression de Sirt1 favorise l'évolution de la NAFLD et de la résistance à l'insuline qui y est associée (Jooho Lee et al. 2017). L'alimentation permet l'apport de donneurs de groupements méthyles et acétyles et module ainsi la biodisponibilité de ces composés. La supplémentation alimentaire en donneurs de méthyle, permet de stopper la progression de la NAFLD chez la souris (Dahlhoff et al. 2014). Nous pouvons donc imaginer un effet similaire concernant les donneurs d'acétyle étant donné leur faculté d'atténuation de la fibrose hépatique (Takemura et al. 2018).

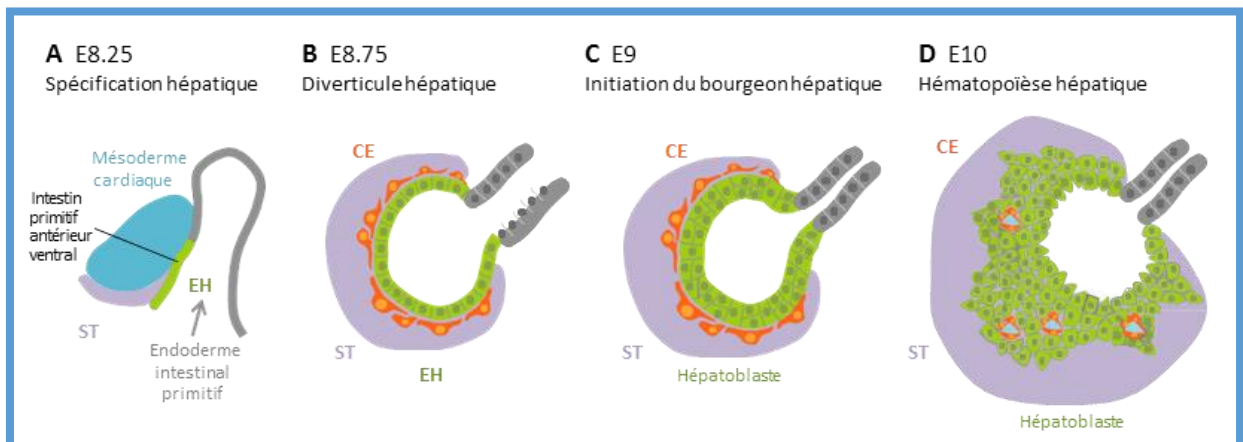
De plus en plus de données obtenues sur des modèles animaux ou chez l'être humain suggèrent l'implication de mécanismes épigénétiques dans la déclaration et l'évolution de la stéatose hépatique. Elles suggèrent la participation de l'alimentation et des rythmes circadiens ainsi que l'implication de mécanismes épigénétiques dans l'étiologie de la NAFLD (Jooho Lee et al. 2017; Eslam, Valenti, et Romeo 2018).

Le foie est donc un organe essentiel à la régulation du métabolisme lipidique et glucidique ainsi que de la balance énergétique. Un déséquilibre dans ces processus de régulation peut entraîner le développement d'une obésité ainsi qu'une NAFLD potentiellement évolutive vers la cirrhose puis l'hépatocarcinome. Le bon fonctionnement de cet organe est donc essentiel à la santé et aux fonctions de l'organisme dans son ensemble. Des perturbations au cours du développement hépatique pourraient donc favoriser l'apparition de dysfonctionnements pendant les périodes post-natales ainsi qu'à l'âge adulte et ainsi favoriser l'installation d'une obésité et des comorbidités qui lui sont associées.

## **2) Développement et fonctions hépatiques in utero**

Le foie est un organe central de la régulation métabolique, l'insuffisance hépatique constitue donc un problème de santé majeur. Comprendre comment cet organe complexe se développe durant l'embryogenèse peut permettre une meilleure compréhension des événements et mécanismes pouvant mener à des défauts de fonctionnement à l'âge adulte. Le processus d'organogenèse hépatique est étudié notamment chez la souris et l'être humain.





**Figure 20. Etapes aboutissant à la formation du bourgeon hépatique**

**A.** Représentation en vue sagittale de la portion céphalique de l’embryon de souris à E8.25 faisant apparaître l’endoderme hépatique (EH, en vert) primitif. La convergence du mésoderme cardiaque et du septum transversum (ST, en mauve) est requise à la spécification hépatique. **B.** À E8.75, les cellules endothéliales (CE, en orange) entourent l’EH, ce qui initie un processus de bourgeonnement dans le ST. Les CE contribuent à la spécification hépatique. **C.** À E9, l’EH se pseudostratifie. **D.** À E10, les cellules endodermiques hépatiques (hépatoblastes) prolifèrent et migrent dans le ST pour former le bourgeon hépatique. Les CE sont aussi nécessaires à la formation du bourgeon. Les cellules progénitrices hématopoïétiques commencent à migrer pour établir l’hématopoïèse hépatique fœtale.

Adapté de Gordillo et al., 2015

	Souris (jours)	Humain (jours)
Endoderme	7.5	< 23
Diverticulum hépatique : spécification des hépatoblastes	8.5 - 9.0	23 - 26
Bourgeon hépatique : migration et prolifération des hépatoblastes	9.5	26 - 32
Excroissance du bourgeon hépatique : prolifération des hépatoblastes et expansion des sinusoides	9.5 - 14.5	31 - 56
Différentiation en hépatocytes et cholangiocytes	13.5 (initiation) - 18.5 (arrêt)	56/58 (initiation) - ≈ 210 (arrêt)
Durée de la gestation	18-19	266-280

**Tableau 3. Développement hépatique chez la souris et l’humain**

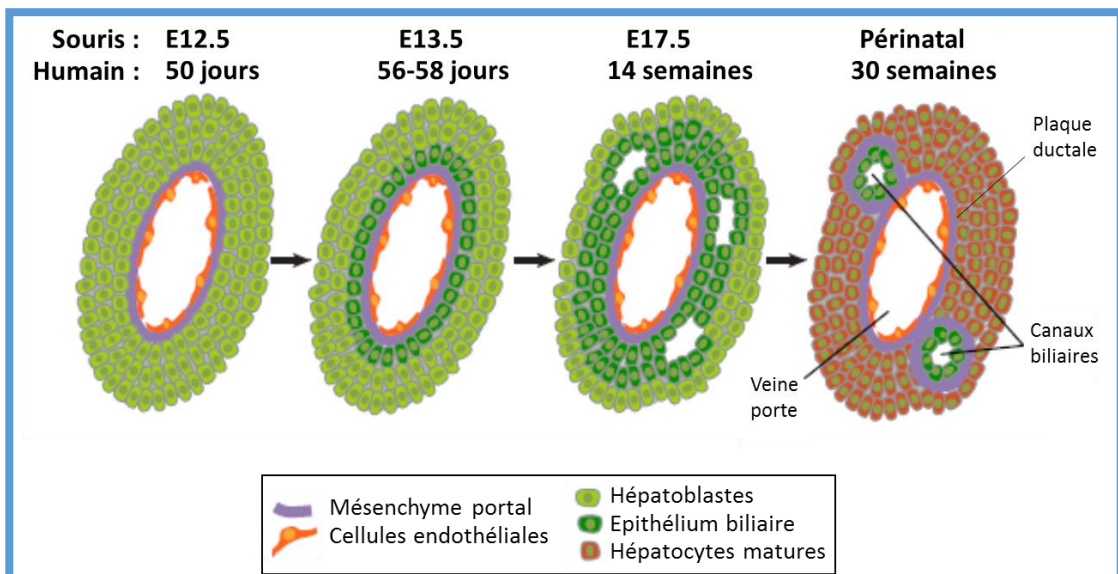
Adapté de Gordillo et al. 2015

## 2.1) Développement *in utero*

### 2.1.1) Développement et morphogenèse hépatique

Les deux types cellulaires principaux du foie, hépatocytes et cholangiocytes, proviennent de l'endoderme, feuillet interne de l'embryon, formé à **E7.5** chez la souris et à partir de la **3<sup>ème</sup> semaine** de grossesse chez l'être humain (**Tableau 3**). Cette structure forme le tube intestinal primitif le long de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon murin et donne ensuite différentes structures telles que le foie, le pancréas ventral, l'estomac, les poumons et la thyroïde (Tremblay et Zaret 2005). Le processus de germination hépatique est entamé à **E9** chez la souris et à **23 jours** de grossesse chez l'être humain. Le tube intestinal primitif s'épaissit alors pour former le *diverticulum* hépatique en évoluant d'une monocouche de cellules endodermique à un ensemble de couches de cellules pseudo-stratifiées appelées les hépatoblastes. Celles-ci migrent afin de former le bourgeon hépatique. Sa partie antérieure formera le foie et le système biliaire intra hépatique, tandis que la partie postérieure formera la vésicule biliaire et le système biliaire extra-hépatique (Gordillo, Evans, et Gouon-Evans 2015).

Suite à leur migration, les hépatoblastes commencent à proliférer et à se différencier en hépatocytes et cholangiocytes. Ces étapes aboutissent à la formation du bourgeon hépatique à **E10** chez la souris et durant la **5<sup>ème</sup> semaine** de grossesse chez l'homme (**Figure 20**). La formation du bourgeon se fait conjointement au développement des cellules progénitrices hématopoïétique. Dans le même temps, une monocouche de cellules mésothéliales immatures apparaît à **E10.5** et tapisse les lobes hépatiques murins en cours de développement (Gordillo, Evans, et Gouon-Evans 2015). A partir d'**E12.5** chez la souris et **50 jours** de grossesse chez l'être humain, le foie se divise en lobes hépatiques distincts jusqu'à atteindre une architecture hépatique « mûre » à **E14.5** chez la souris et à **56 jours** de grossesse chez l'être humain. La différenciation des hépatoblastes commence environ à **E13.5** chez la souris et à **56-58 jours** de grossesse chez l'être humain (**Tableau 3**). Chez l'être humain, les précurseurs des cholangiocytes sont formés au niveau de la plaque ductale à partir d'hépatoblastes entourant les veines portes tandis que les hépatoblastes qui sont éloignés de la zone de la veine porte se différencient en hépatocytes (Ruebner et al. 1990). Les tubules biliaires se forment à partir des cholangiocytes, à **E17.5** chez la souris et à environ **14 semaines** de grossesse chez l'être humain, par bourgeonnement depuis la plaque ductale, qui



**Figure 21. Maturation hépatique et biliaire chez la souris et l'humain**

La différenciation des hépatoblastes mène à la production de cholangiocytes, formant l'épithélium biliaire, et d'hépatocytes qui vont mûrir au fur et à mesure du développement intra-utérin. Les tubules biliaires se forment à partir des cholangiocytes, par bourgeonnement depuis la plaque ductale.

Adapté de Gordillo et al., 2015

régresse petit à petit. La différenciation des cholangiocytes se termine en période néonatale chez la souris et à environ **30 semaines** de grossesse chez l'être humain, bien que quelques cellules de la plaque ductale puissent persister chez les nouveau-nés, les enfants et même jusqu'à l'âge adulte (**Figure 21**)(Gordillo, Evans, et Gouon-Evans 2015).

Au cours des dernières semaines de développement chez l'être humain, l'inhibition des enzymes glycolytiques, couplée à l'augmentation de la production d'enzymes néoglucogéniques, reflète la maturation du foie. Sa maturation se fait par l'installation définitive des systèmes d'irrigation sanguine et biliaire et continue après la naissance, tout en conservant l'architecture anatomique acquise au cours du développement fœtal. Cette maturation est accompagnée d'une diminution de la fluidité des membranes des hépatocytes, due à une diminution du ratio protéines/lipides et une augmentation de la proportion de cholestérol membranaire (Gordillo, Evans, et Gouon-Evans 2015).

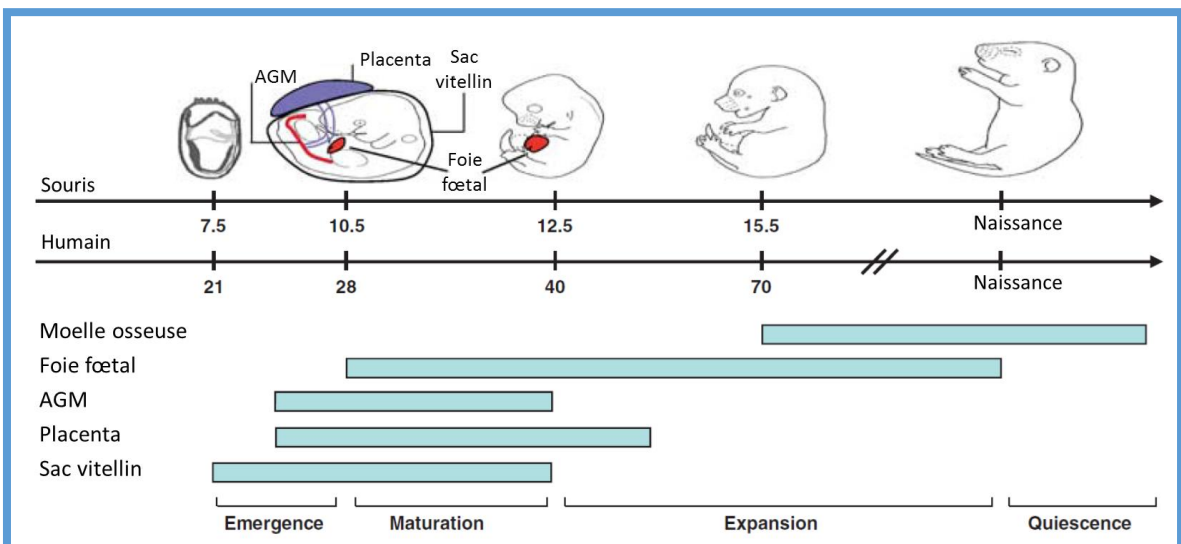
### **2.1.2) Régulation du développement hépatique**

Les mouvements morphogénétiques exposent les cellules à différents processus de signalisation au cours du développement hépatique. Les voies de signalisation principalement empruntées lors de l'hépatogenèse comprennent celles contrôlées par Tgf $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), Wnt, Fgf (*fibroblast growth factor*), Notch et les ligands de Bmp (*bone morphogenetic protein*). Cependant, la manière dont les signalisations Bmp, Fgf et Wnt interagissent est incertaine. La signalisation liée à Wnt est essentielle à la spécification hépatique, néanmoins, aucune étude n'a pu identifier clairement de fonction à la voie Wnt durant la spécification hépatique chez la souris (Gordillo, Evans, et Gouon-Evans 2015). L'expansion des hépatoblastes est régulée par leurs interactions avec les cellules endothéliales et mésenchymales. La différenciation des hépatoblastes en hépatocytes et cellules biliaires s'effectue dans les environs du mésenchyme portal, de manière régulée par Tgf $\beta$ , Notch, Wnt, Bmp et Fgf. Différents mécanismes sont impliqués, en particulier, un gradient de Tgf $\beta$  est établi entre la zone portale et le parenchyme et permet la différenciation des hépatoblastes (Clotman 2005). Au cours de l'hépatogenèse, les cholangiocytes génèrent des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire et les hépatoblastes de l'angiopoïétine I, participant ainsi conjointement au développement du système vasculaire hépatique. Le déroulement de cette étape dépend des espèces, chez la souris les canaux biliaires se développent avant les artères hépatiques tandis que c'est le contraire chez l'être humain (Fabris et al. 2007). Enfin,

la maturation des hépatocytes et la croissance hépatique est promue par l'action de facteurs tels que les glucocorticoïdes, l'Hgf et Wnt (Gordillo, Evans, et Gouon-Evans 2015).

De nombreux facteurs de transcription et régulateurs épigénétiques sont impliqués dans le développement hépatique. Les acteurs majoritaires appartiennent aux familles de protéines de liaison à l'ADN FoxA (*forkhead box A*) et GatA (Gordillo, Evans, et Gouon-Evans 2015). Une étude réalisée par immunoprécipitation de la chromatine a permis d'identifier un groupe de facteurs de transcription parmi lesquels se trouvent Foxa2 et plusieurs facteurs nucléaire hépatiques (Kyrnizi 2006). La stabilité et la flexibilité de ces facteurs de transcription sont contrôlées entre autres par le placement différentiel de marques épigénétiques. Les hépatoblastes progéniteurs vont se différencier en fonction de la présence de marques au niveau d'éléments régulateurs du développement hépatique et pancréatique (C.-R. Xu et al. 2011). Par exemple, l'acétylation de H3K9/K14 (généralement associées à des régions transcriptionnellement actives) est enrichie dans les régions en amont des éléments régulateurs du gène *Pdx1*. De plus, H3K27me3 (généralement associée à des régions transcriptionnellement inactives) ainsi que la méthyl transférase *Ezh2* sont aussi associées préférentiellement à *Pdx1*. Ces caractéristiques font que *Pdx1* peut être activé ou réprimé en tant que progéniteur endodermique et donner ainsi soit une identité pancréatique, soit une identité hépatique aux hépatoblastes. La programmation à devenir une cellule hépatique nécessite de plus une acétylation des histones de manière dépendante à l'acétyl-transférase p300 (C.-R. Xu et al. 2011). L'action d'*Ezh2* est nécessaire plus tardivement, pour la croissance et la maturation des cellules hépatiques embryonnaires, son inhibition à E8.5 entraînant une diminution significative du tissu hépatique, tandis que son inhibition à E13.5 inhibe partiellement la différenciation en hépatocytes (Koike et al. 2014).

Le développement et la morphogenèse hépatique sont donc des processus complexes, extrêmement contrôlés et régulés. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la formation d'un foie mûre et fonctionnel, celles sous le contrôle de Tgfb $\beta$  étant prédominantes tout au long du développement. La signalisation entre les différents types cellulaires est nécessaire à leur spécialisation et à l'établissement de l'architecture hépatique. Enfin, l'action de facteurs de transcription associés à des modifications post-traductionnelles des histones confèrent une flexibilité et une adaptabilité aux cellules au cours de leur différenciation et spécialisation.



**Figure 22. Etapes aboutissant à l'établissement définitif des CSH au cours du développement embryonnaire**

Les barres représentent l'âge auquel chaque site hématopoïétique est actif chez la souris et l'humain.

AGM – aorte-gonade-mésonephros

Adapté de Luis et al., 2012

## 2.2) Fonctions hépatiques au cours du développement fœtal

### 2.2.1) Fonction hématopoïétique chez le fœtus

Au cours de son développement, le tissu hépatique va avoir différentes fonctions. Lors des phases les plus précoces, le foie est un site majeur de l'établissement des **fonctions hématopoïétiques**, le processus au cœur de la production et du renouvellement des cellules sanguines. Le foie fœtal est le principal site d'expansion et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques (**CSH**) et, bien que quelques progéniteurs hématopoïétiques soient détectés à partir d'**E9.5** chez la souris, les premières CSH définitives le colonisent à environ **E11.5** (**Figure 22**) (Luis, Killmann, et Staal 2012). A **E11.5**, le foie devient la source principale de cellules hématopoïétiques durant la gestation, bien qu'il ne génère pas de cellules hématopoïétiques lui-même. La production est assurée par les CSH qui ont colonisé le foie, se multiplient et mûrissent en son sein (Luis, Killmann, et Staal 2012).

L'hématopoïèse dans le foie fœtal chez la souris peut être décomposée en quatre phases (Sasaki et Sonoda 2000) :

- phase I : enclenchement de l'hématopoïèse (E10.5) ;
- phase II : augmentation du volume de cellules hématopoïétiques (E11 – E12) ;
- phase III : pic du volume du compartiment hématopoïétique (E13 – E14) ;
- phase IV : début de l'atténuation de la fonction hématopoïétique (à partir d'E15).

Pendant le développement, d'autres sites prennent progressivement en charge l'hématopoïèse : le thymus à partir d'**E13**, la rate à partir d'**E15** et finalement la moelle osseuse à partir d'**E16**. Néanmoins, l'hématopoïèse se poursuit dans le foie jusqu'à une semaine après la naissance (Crawford, Foley, et Elmore 2010). Par la suite, c'est la moelle osseuse qui assurera l'hématopoïèse.

### 2.2.2) Métabolisme et fonctions hépatiques chez le fœtus et en période post-natale

Au cours du développement *in utero*, les fonctions métaboliques fœtales sont assurées grâce au foie maternel car les métabolites et nutriments nécessaires sont apportés par le placenta, d'où ils seront directement transfusés au fœtus. Avant la naissance, les nutriments apportés au fœtus sont constitués de glucides et d'acides aminés, le métabolisme consiste alors en l'oxydation de ces derniers. Au cours de la morphogenèse, le foie acquiert sa capacité métabolique au fur et à mesure que progresse la maturation des hépatocytes. Chez la

souris, la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes débute à **E14.5**. La fonction hématopoïétique laisse alors peu à peu place aux fonctions métaboliques. A la naissance, l'environnement protecteur maternel disparaît brutalement et le nouveau-né doit rapidement activer ses mécanismes de thermogénèse (Girard 1993). Après la naissance, le lait maternel apporte surtout des lipides et peu de glucides, le métabolisme doit alors assurer la glucogénèse *de novo* ou néoglucogénèse et l'apport d'énergie via l'oxydation des lipides. **Le nouveau-né doit donc adapter son métabolisme à une transition nutritionnelle importante. Le foie joue alors un rôle important dans ce processus** (Oden et Treem 2003; Crawford, Foley, et Elmore 2010).

### **Métabolisme glucidique**

La glycémie du fœtus est en équilibre avec celle de la mère. Au cours du développement, le glucose est la source principale d'énergie pour le fœtus. La production endogène de glucose, en particulier la néoglucogénèse, est négligeable tant que l'apport placentaire est maintenu. En fin de gestation, la maturation des hépatocytes entraîne une augmentation de l'activité néoglucogénique et du stockage du glycogène dans le fœtus (Hammon et al. 2012). Le foie fœtal contient les enzymes nécessaires à la néoglucogénèse et à la synthèse de glycogène à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de grossesse chez l'être humain. Malgré cela, la néoglucogénèse n'a pas lieu *in utero*, dans des conditions physiologiques normales. A partir de la 8<sup>ème</sup> semaine, les dépôts de glycogène hépatique augmentent jusqu'au terme de la grossesse. Ils servent à maintenir la glycémie au cours des heures suivant la naissance (Grijalva et Vakili 2013). Le taux de dépôt de glycogène est différent dans chaque espèce et dépend de la durée de la gestation, du nombre de fœtus, et des apports énergétiques maternels (Hammon et al. 2012).

Chez le nouveau-né, le lactate, les acides aminés (en particulier l'alanine) et le glycérol sont utilisés comme substrats pour assurer la néoglucogénèse au cours des 8h suivant la naissance. Le déclin du stockage hépatique du glycogène, immédiat après la naissance, évolue en parallèle d'une augmentation de l'activité G6Pase. Cet accroissement d'activité favorise le relargage de glucose dans la circulation sanguine (Hammon et al. 2012; Grijalva et Vakili 2013).

Un facteur limitant la néoglucogénèse fœtale, chez le rat, est la faible activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (**PEPCK**). Son activité augmente néanmoins à partir de la naissance et permet la néoglucogénèse dès 2h après la naissance. La néoglucogénèse est régulée par l'insuline et le glucagon dès la naissance (S. Kalhan et Parimi 2000).



## **Métabolisme lipidique**

Les triglycérides apportés par la circulation materno-fœtale subissent la lipolyse dans le placenta, assurant ainsi l'apport d'acides gras (AG) au fœtus. Cependant, étant donné que la  $\beta$ -oxydation fœtal est faible, les AG peuvent être utilisés pour la synthèse de TG *de novo* dans le tissu adipeux. Après la naissance et le passage à la nutrition orale lactée, l'oxydation des AG augmente rapidement afin de couvrir les besoins énergétiques du nouveau-né (Oden et Treem 2003; Grijalva et Vakili 2013).

Un rôle important de l'oxydation des AG après la naissance est la production d'ATP, nécessaire à la néoglucogenèse, tandis que la production de corps cétoniques dépend du développement de l'organisme au cours de la lactation (Oden et Treem 2003).

Au cours de l'allaitement, la lipolyse est déclenchée en raison d'une sensibilité accrue aux hormones lipolytiques (par exemple, la thyrotropine) et d'une diminution du rapport insuline / glucagon plasmatique. Une lipolyse élevée fournit des AG non estérifiés, pour la  $\beta$ -oxydation et la synthèse de corps cétonique, principalement l'acétoacétate et l'hydroxybutyrate (Oden et Treem 2003; Grijalva et Vakili 2013). **Le contrôle hépatique fœtal et post natal de l'oxydation des AG est donc principalement accru par un ratio glucagon / insuline élevé.**

## **Autres fonctions métaboliques**

La synthèse de protéines plasmatiques et le maintien de leur homéostasie sont des fonctions vitales assurées par le foie. Au cours du développement, les substrats nécessaires à la synthèse protéiques proviennent des AA transportés jusqu'aux hépatocytes (Grijalva et Vakili 2013).

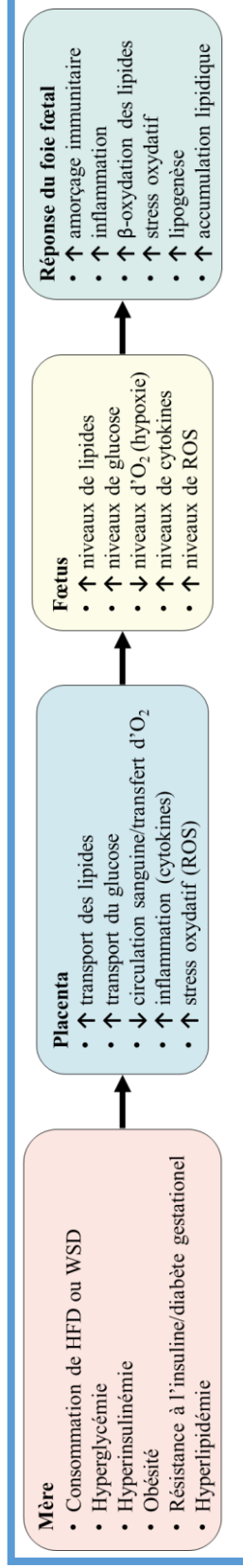
La bilirubine provient de la métabolisation de l'hème et est toxique pour l'organisme. La capacité à l'éliminer apparaît au cours du développement hépatique (Grijalva et Vakili 2013).

Les premiers acides biliaires, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, sont synthétisés dans le foie à partir de cholestérol. Pendant les dernières semaines de la grossesse, une augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse d'acides biliaires se produit, augmentant le pool d'acides biliaires. Après la naissance, ce pool va peu à peu migrer du foie, jusqu'aux intestins (Grijalva et Vakili 2013).

Enfin, le foie joue un rôle critique dans la modulation de l'absorption, de l'excrétion et du métabolisme des xénobiotiques et des sous-produits du métabolisme endogène (Grijalva et Vakili 2013).

La plupart des enzymes impliquées dans ces biotransformations sont différenciellement exprimées au cours de la période périnatale et peuvent être sujettes à des altérations développementales (Grijalva et Vakili 2013).

Le développement morphologique et fonctionnel du foie est donc un processus complexe, faisant intervenir une multitude d'acteurs et de mécanismes participant à son contrôle et à sa régulation. Une perturbation au cours de ces étapes essentielles peut entraîner des altérations de fonctions ou de structure à l'âge adulte, ce qui peut participer au développement de pathologies hépatiques et avoir un impact sur l'organisme au complet. La nutrition *in utero* et post-natale joue un rôle majeur dans le développement du foie. Une alimentation maternelle inadaptée au cours de la grossesse ou pendant la période de lactation pourrait donc avoir un effet néfaste dans le développement hépatique. L'étude de l'impact de l'alimentation et de la physiologie maternelle sur le développement hépatique de la descendance est donc nécessaire afin d'évaluer en quelle mesure ces paramètres peuvent favoriser l'apparition de pathologies à court et long terme.



**Figure 23. Facteurs précoces de programmation de la NAFLD**

Au cours de la grossesse, la consommation de nourriture riche en lipides et en glucides peut entraîner un diabète en plus de l'obésité, associé à un accroissement des niveaux de lipides et de glucose, qui sont transférés au fœtus via le placenta. La résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie maternelle peuvent altérer les fonctions placentaires, ce qui fait décroître le flux sanguin et diminue l'apport d'oxygène au fœtus. Une augmentation de l'inflammation et de la production de cytokines par le placenta surviennent aussi dans ce contexte. Ensemble, ces facteurs contribuent au développement d'un phénotype pathologique chez la descendance.

HFD – high fat diet (régime riche en lipides) ; WSD – western style diet (régime riche en lipides et en sucres raffinés) ; ROS – reactive oxygen species (composés réactifs de l'oxygène)

Adapté de Wesolowski et al., 2017

### **3) Programmation et conditionnement développemental dans le foie par la physiologie maternelle**

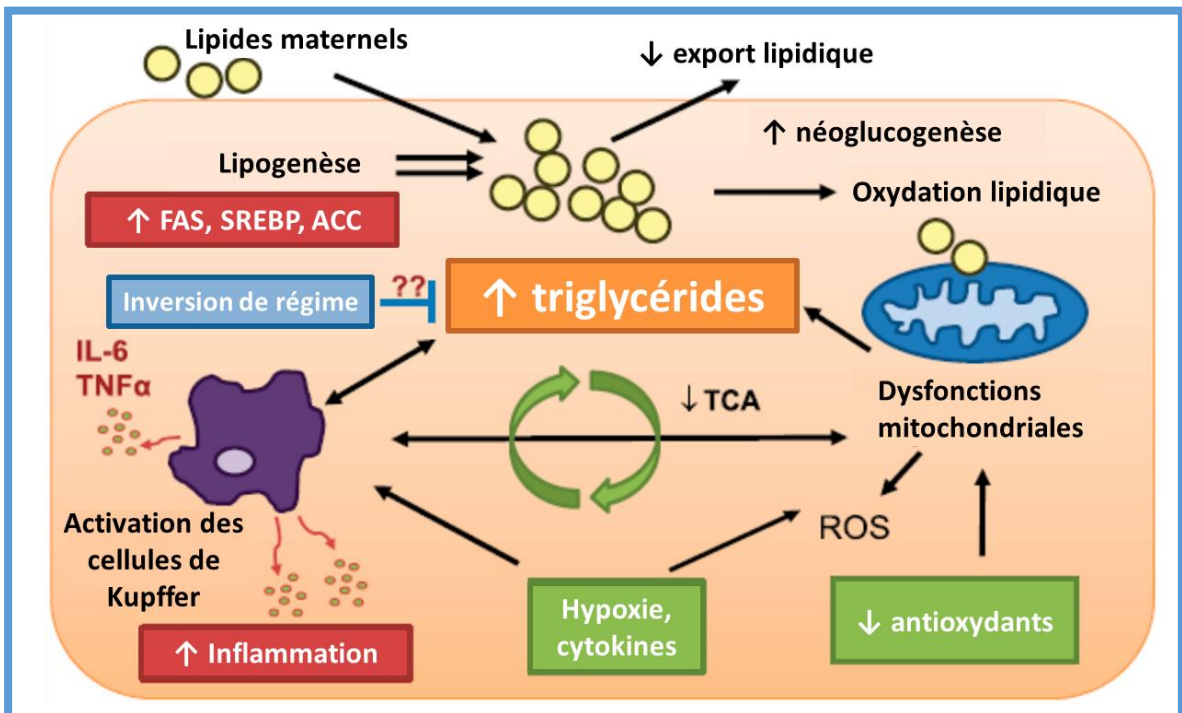
L'obésité maternelle est généralement la conséquence d'une alimentation trop riche. Le déroulement d'une grossesse en contexte d'obésité maternelle, liée à la nutrition, expose donc le fœtus à de nombreux facteurs pouvant perturber son développement.

#### **3.1) Effets de la nutrition maternelle sur le phénotype hépatique des descendants adultes**

L'alimentation peut être source d'une multitude de substances ayant potentiellement un effet néfaste sur la croissance fœtale et la santé des descendants à plus ou moins long terme. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études se sont intéressées à la manière dont l'exposition à une alimentation déséquilibrée affecte le développement de maladies du stade fœtal à l'âge adulte. De plus en plus de preuves attestent de l'impact de la physiologie maternelle et de la possibilité de transmettre ce phénotype à la descendance, menant à un cercle vicieux de troubles métaboliques à travers les générations (**Figure 23**) (Wesolowski et al. 2017).

##### **3.1.1) *Western diet* (WSD, dit régime occidental)**

Chez les rongeurs, plusieurs études montrent qu'une exposition continue à un WSD, au cours de la gestation et de la vie post-natale, entraîne des dommages hépatiques et une progression rapide de la fibrose hépatique au cours des 20 semaines suivant la naissance (Friedman 2018). Une étude chez la souris démontre que l'exposition au WSD au cours de la gestation et/ou pendant la lactation amorce la NAFLD chez les descendants mâles à l'âge adulte. L'exposition au cours des phases précoces de la vie résulte en une hépatomégalie, une accumulation de TG et de cholestérol dans le foie, une augmentation de la synthèse de lipides *de novo* ainsi qu'une augmentation d'expression de marqueurs inflammatoires et de marqueurs des macrophages, comme par exemple  $Tnf\alpha$  et  $Tgf\beta$  (Pruis et al. 2014). Chez l'être humain et le macaque, un régime WSD augmente l'adiposité et la résistance à l'insuline des mères, bien que ces effets ne soient pas systématiquement observés (Friedman 2018). Consommé pendant la gestation, le régime WSD augmente les dépôts lipidiques intra-



**Figure 24. Schéma simplifié des effets de la programmation hépatique de la descendance exposée au régime WSD maternel chez le primate non-humain**

Les descendants de mères sous régime WSD montrent une augmentation de l'expression de gènes néoglucogéniques, du stress oxydatif et de l'accumulation de triglycérides. L'étude métabolomique globale du foie fœtal révèle une diminution des intermédiaires du cycle TCA, une augmentation du métabolisme des AA et une augmentation de la néoglucogenèse, indiquant un recours accru au métabolisme des AA pour subvenir aux besoins fœtaux. Les dysfonctions mitochondriales et d'oxydation des lipides, associées à une activité antioxydante limitée, accroissent le stress oxydatif et les lésions hépatiques en amont du développement d'une obésité. En période post-natale, ces descendants présentent une activation immunitaire innée, la production d'IL-6 (interleukine 6) et TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) par les cellules de Kupffer, participant à cette inflammation. De plus il est constaté une augmentation persistante de l'expression de gènes lipogéniques : FAS (AG synthase), SREBP (sterol regulatory element binding protein), ACC (acétyl-CoA carboxylase), même après un régime contrôle post-sevrage.

ROS – composé réactif de l'oxygène

Adapté de Friedman et al., 2018

hépatiques fœtaux à partir du début du 3<sup>ème</sup> trimestre. Cet effet est observé de manière indépendante de l'obésité maternelle, révélant ainsi la programmation développementale de la descendance par l'alimentation maternelle. En cas d'obésité maternelle associée à un WSD au cours de la gestation, chez les macaques, les effets sont aggravés. Au niveau du foie fœtal, le stress oxydant, l'apoptose et l'expression de gènes de la lipogenèse sont augmentés, associés à une altération de la structure de la chromatine (Friedman 2018). Des effets à long terme sont aussi constatés : les descendants de mères sous régime WSD présentent des dysfonctionnements immunitaires et des modifications nécro-inflammatoires dans le foie, malgré le fait qu'ils aient été soumis à un régime contrôle après le sevrage (**Figure 24**) (Friedman 2018).

Néanmoins, un retour à un régime contrôle en période préconceptionnelle semble être une contre-mesure efficace pour atténuer, en partie, les altérations de voies métaboliques critiques, qui aboutissent généralement au développement de pathologies chez la descendance (Friedman 2018).

Les disparités qui peuvent être observées entre les différentes études de surnutrition peuvent être expliquées par le type de régime utilisé dans chacune de ces études. En particulier, la quantité et la qualité des lipides consommés peuvent influencer différemment sur la susceptibilité à développer une NAFLD (Mennitti et al. 2015; Monks et al. 2018; Hryhorczuk et al. 2017).

### **3.1.2) Perturbations hépatiques par la nutrition hyperlipidique maternelle (HFD)**

Plusieurs études utilisant l'imagerie par résonance magnétique ont montré une association entre l'IMC maternel et l'accumulation de lipides intra-hépatique chez le nouveau-né (Modi et al. 2011; Brumbaugh et Friedman 2014). En particulier, il a été montré que cette accumulation est indépendante de la masse adipeuse sous-cutanée du nouveau-né. Cette information amène à penser que le stockage lipidique hépatique est directement lié à l'excès d'AG apporté par la nutrition hyperlipidique maternelle, de manière indépendante au développement du tissu adipeux (Brumbaugh et Friedman 2014).

Une hypothèse avancée est que l'exposition à l'obésité maternelle, au cours des périodes périconceptionnelles et de la fin de grossesse, représentent deux « événements » conduisant à la programmation de l'obésité chez la descendance, ou du moins à son conditionnement, c'est-à-dire à l'augmentation de la sensibilité à un environnement obésogène. Le premier de ces « événement » a lieu en période périconceptionnelle et aboutit à

l'augmentation de la masse adipeuse, en particulier au niveau viscéral, et à une programmation de modification de la signalisation de l'insuline et du métabolisme des AG dans le foie et les muscles squelettiques des descendants. Le second « évènement » se produirait avec l'exposition à l'obésité maternelle en fin de grossesse, entraînant une augmentation du tissu adipeux sous-cutané, une augmentation d'expression de la leptine dans les dépôts adipeux viscéraux et sous-cutanés et l'émergence d'une résistance centrale à la leptine pendant la vie post-natale (L M Nicholas et al. 2016).

Un grand nombre de modèles animaux expérimentaux, utilisant diverses approches diététiques, ont fourni des preuves détaillées établissant un lien entre un environnement obésogène maternel et le développement de la NAFLD chez la progéniture (**Tableau 1**, page 17). Un régime HFD maternel peut mener au développement de NAFLD chez les descendants, indépendamment de l'obésité maternelle ou de celle des descendants (McCurdy et al. 2009; Oben et al. 2010; Gregorio et al. 2010). Chez le macaque, la consommation chronique d'un régime HFD avant et pendant la gestation est associée à une stéatose hépatique fœtale, qui persiste pendant la phase juvénile des descendants, indépendamment de l'obésité maternelle (McCurdy et al. 2009). De manière intéressante, changer le régime HFD maternel pour un régime contrôle pendant la gestation améliore le phénotype des descendants, reflétant ainsi l'importance du régime maternel gestationnel dans la programmation du dépôt de lipides hépatique de la progéniture (McCurdy et al. 2009). Des résultats similaires ont été observés chez les rongeurs : un régime HFD consommé de la période préconceptionnelle à la lactation induit le développement d'une stéatose hépatique chez les descendants à l'âge adulte, bien qu'étant sous régime contrôle après le sevrage (Oben et al. 2010; Gregorio et al. 2010; M. Li et al. 2015; C. Lynch, Chan, et Drake 2017).

Une étude chez l'être humain, utilisant un marquage des AG par isotopes stables, démontre que la source principale du gras qui s'accumule dans le foie provient des AG libres du sérum, suivi de peu par une activation de la lipogenèse *de novo* (Donnelly et al. 2005). Etant donné que la lipolyse ne commence que tardivement durant la vie fœtale, les AG apportés par l'alimentation maternelle seraient la cause directe de l'accumulation de lipides intra-hépatique. Ces résultats illustrent bien un premier « évènement » de lipotoxicité lié à l'alimentation maternelle (M. Li et al. 2015). De nombreuses études associent l'exposition au régime HFD maternel en périodes périconceptionnelle et périnatale à un régime HFD après sevrage. Cette association entraîne le développement de NASH chez les jeunes adultes, tandis que sous régime contrôle, ils développent une simple stéatose hépatique. Le régime HFD

maternel pourrait donc augmenter la vulnérabilité des descendants à développer une NASH plutôt qu'une stéatose (M. Li et al. 2015; C. Lynch, Chan, et Drake 2017).

Dans le cas de pair-feeding HFD chez le rat, le poids, l'adiposité et la leptinémie sont diminués chez les mères et les descendants, comparés à ceux sous régime HFD *ad libitum* (White, Purpera, et Morrison 2009). La tolérance à l'insuline est normalisée chez les descendants en pair-feeding, et bien que les paramètres hépatiques n'aient pas été explorés dans cette étude, les paramètres physiologiques vont dans le sens d'une amélioration des fonctions hépatiques liées aux métabolismes glucidique et lipidique.

La quantité de lipides alimentaires peut donc affecter le développement hépatique de la descendance, de même que le type de lipides présents dans l'alimentation maternelle. Plusieurs études ont évalué, chez l'être humain et le rat, les effets de différents types de lipides consommés pendant la gestation et / ou au cours de la lactation, sur la santé des mères et de leurs descendants (Mennitti et al. 2015; Hryhorczuk et al. 2017). Une alimentation riche en AG trans-estérifiés ou en AG à chaîne courte est généralement associée à des défauts développementaux et métaboliques chez la descendance tandis qu'une alimentation riche en AG polyinsaturés semble avoir des effets bénéfiques sur le développement et la régulation épigénétique des descendants, prévenant ainsi l'obésité, la résistance à l'insuline et l'apparition de troubles cardio-vasculaires. Les AG mono-insaturés en revanche semblent avoir un effet modéré de stimulation de la thermogénèse associé à une amélioration du métabolisme hépatique, ce qui favorise la santé des descendants (Mennitti et al. 2015).

L'étude des métabolites chez les mères et leurs descendants permet d'apporter davantage de détails. Les métabolites plasmatiques associés à la surnutrition maternelle et qui indiquent des dysfonctions mitochondriales incluent entre autres le glucose, les AG, les TG, les AA ramifiés (**BCAA** pour *branched-chain amino acid*) et les espèces d'acylcarnitine à chaîne longue. Ces métabolites sont particulièrement associés à un poids de naissance élevé des descendants (Baker et Friedman 2018). La capacité de la mère à transmettre des lipides à la descendance joue un rôle important, en période de lactation chez la souris, les mères résistantes au développement d'une obésité ont un lait enrichi de 24% en TG. Cet enrichissement est associé, chez la descendance des deux sexes, à une augmentation de poids, des dysfonctionnements mitochondriaux, des dommages hépatiques et, pour les mâles uniquement, une inflammation des adipocytes (Hryhorczuk et al. 2017).

Une étude transgénérationnelle chez la souris, faite de F0 à F3, montre que le régime HFD induit progressivement une stéatose hépatique chez la descendance. Les effets sont de plus en plus prononcés au fur et à mesure des générations avec l'apparition, en plus de la



NAFLD, d'une augmentation de production de leptine à partir de la génération F2. Ces résultats suggèrent que des événements de programmation de la NAFLD peuvent s'accumuler de manière intergénérationnelle (J. Li et al. 2012).

Les mécanismes impliqués dans la programmation de la NAFLD sont multifactoriels. En particulier, la dérégulation du métabolisme lipidique et glucidique maternel et la lipogenèse *de novo* à partir du stade fœtal, sont les principales causes de la stéatose hépatique de la descendance, dans un environnement obésogène. Au niveau moléculaire, la lipogenèse *de novo*, les dysfonctionnements mitochondriaux, le stress du réticulum endoplasmique (**RE**) ainsi que les réponses inflammatoires, sont les principales voies susceptibles de s'adapter de manière durable à un environnement obésogène, lors des phases précoces de la vie.

### **3.2) Mécanismes de programmation développementale du métabolisme hépatique**

#### **3.2.1) Altération des voies de signalisation et acteurs moléculaires**

##### **Altérations placentaires**

L'obésité entraîne une hyperinsulinémie maternelle qui perdure pendant la grossesse et, bien que l'insuline maternelle ne traverse pas le placenta, une résistance à l'insuline maternelle peut directement augmenter l'inflammation placentaire. Cette inflammation entraîne une altération des apports en nutriments et des fonctions placentaires, l'association de ces facteurs semble être une preuve que l'augmentation du risque de NAFLD peut commencer *in utero* (Wesolowski et al. 2017). De plus, le régime HFD maternel entraîne un retard de croissance fœtale associé à des modifications d'expression de gènes dans le placenta et le foie fœtal, à terme de gestation chez la souris (E18.5) (Panchenko et al. 2016) et chez la lapine (G28) (Tarrade et al. 2013). De manière intéressante, parmi les gènes différentiellement exprimés, l'expression de la *11 $\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase 1 (Hsd11 $\beta$ 1)*, de l'*Insuline Receptor Substrate 1 (Irs1)* et de la *Tryptophane Hydroxylase 1 (Tph1)* est diminuée dans le placenta chez la souris. Leur diminution pourrait amener à des dysfonctions placentaires susceptibles d'affecter la croissance fœtale (Panchenko et al. 2016). Cependant, une perte de poids maternelle préconceptionnelle permet la normalisation de l'expression de *Tph1*, tandis que l'expression de *Hsd11 $\beta$ 1* et *Irs1* n'est que partiellement restaurée.

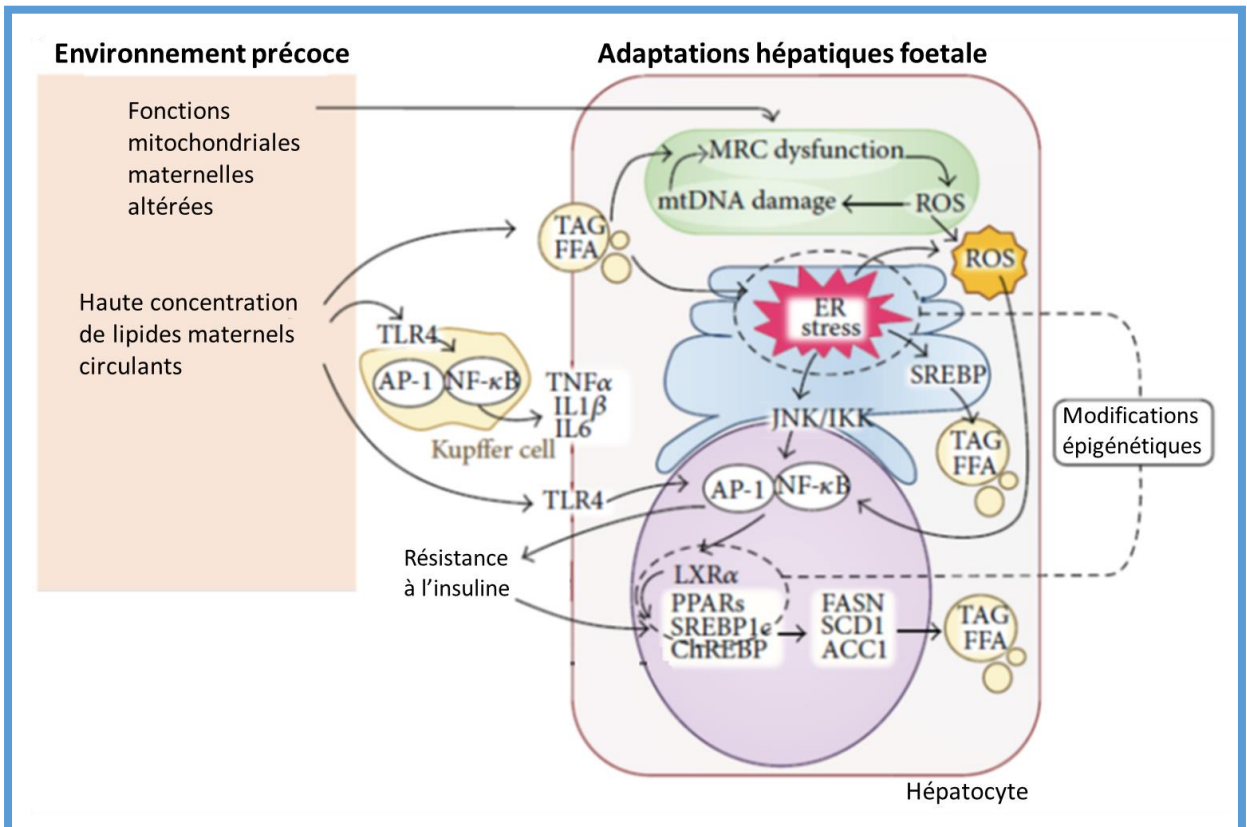
Une large étude métabolomique sur le sang de cordon d'enfants de femmes diabétiques et/ou obèses a permis de mettre en évidence une augmentation de l'abondance en métabolites classiquement considérés comme des biomarqueurs de l'altération du métabolisme mitochondrial hépatique et squelettique, de la résistance à l'insuline et du risque de diabète de type 2 à l'âge adulte (Lowe et al. 2017; Baker et Friedman 2018). Notamment, l'abondance en BCAA et ses catabolites (propionylcarnitine (**C3**), butyrylcarnitine / isobutyrylcarnitine (**C4/Ci4**) et isovalérylcarnitine (**C5**)), est augmentée en lien avec l'IMC maternel. De plus, la glycémie maternelle est associée avec une augmentation de l'abondance en 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxydecanoyl carnitine et glycérol (Lowe et al. 2017). Enfin, des marqueurs de résistance à l'insuline (**C5**) et d'une oxydation mitochondriale incomplète des lipides (catabolites des BCAAs), sont détectés dans le plasma d'enfants de mères obèses et/ou diabétiques, 48 heures après la naissance (Baker et Friedman 2018).

### **Mécanismes de dérégulation du métabolisme lipidique et glucidique**

En termes d'analyses mécanistiques, plusieurs études ont montré chez la souris des modifications d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides ainsi que de la voie de signalisation des PPARs (P. J. Lynch et al. 2015).

Parmi les gènes différentiellement exprimés dans le foie, l'expression de la GCK est diminuée, ce qui peut altérer le métabolisme des glucides (Panchenko et al. 2016). Chez l'agneau, l'expression de gènes néoglucogéniques est altérée dans le foie dans un contexte d'obésité maternelle : l'expression de Hsd11 $\beta$ 1 et de PEPCK (cytosolique et mitochondriale) est diminuée. L'expression de PEPCK mitochondriale est aussi altérée lorsque l'exposition à l'obésité maternelle a lieu en gestation tardive uniquement. Cette modification perdure jusque dans la vie post-natale (L M Nicholas et al. 2016). Le métabolisme glucidique des descendants peut donc être impacté par l'obésité et le régime maternel lors de phases précoces du développement et perdurer lors de la vie post-natale.

Les fœtus de mère diabétiques ou obèses présentent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie, ce qui peut induire la lipogenèse *de novo* (Wesolowski et al. 2017; Rousseau-Ralliard et al. 2019). Dans les études sur modèles animaux, le niveau de la lipogenèse *de novo* peut être augmenté à l'âge adulte en réponse au régime obésogène maternel. Ces études rapportent, à l'âge adulte, une augmentation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la lipogenèse, en particulier le facteur de transcription Srebp1c, ses coactivateurs et plusieurs de ses cibles : des Ppars, la **Fasn** (*fatty acid synthase*) et l'acétyl-CoA carboxylase (**Acc1**) (M. Li et al. 2015; Wesolowski et al. 2017). Différentes causes sont



**Figure 25. Mécanismes potentiels sous-tendant la programmation du développement de la NAFLD.**

L'obésité maternelle et le régime HFD mène a des dysfonctions mitochondriales pouvant participer à la programmation de la descendance. Les lipides circulants maternels apportés au fœtus et transportés au foie contribuent au stress oxydatif, caractérisé par une diminution de la chaîne respiratoire mitochondriale (MRC), une surproduction de composés réactifs de l'oxygène (ROS) et des dommages à l'ADN mitochondrial. L'augmentation de la concentration de triacylglycérol (TAG) et d'acides gras libres (FFA pour *free fatty acids*) participent à augmenter le stress oxydatif, la lipogenèse *de novo* et à activer des réponses inflammatoires. La lipotoxicité maternelle active de plus la voie de l'inflammation des cellules de Kupffer et des hépatocytes via TLR4. Les marqueurs du stress oxydatif et de la lipogenèse *de novo* peuvent être modifiés par des mécanismes épigénétiques précoces, ce qui peut représenter un mécanisme de transmission des risques à développer des maladies de manière intergénérationnelle.

Adapté de Li et al., 2015

proposées pour expliquer l'activation de SREBP1c, entre autres, une altération de la signalisation de l'insuline et du métabolisme des acides gras insaturés (**Figure 25**) (M. Li et al. 2015). Une diminution de l'expression des récepteurs à l'insuline et de phosphorylation d'acteurs de sa signalisation est constatée, en période post-natale, dans le foie et le muscle squelettique des descendants mâles et femelles nés de brebis obèses. La programmation ou le conditionnement de la descendance, par l'obésité maternelle, pourrait donc passer par différents mécanismes, en dérégulant séparément la signalisation à l'insuline et les facteurs néoglucogéniques (L M Nicholas et al. 2016).

L'obésité maternelle est aussi mise en cause dans la dérégulation du métabolisme lipidique hépatique chez les descendants, en particulier la lipogenèse et la  $\beta$ -oxydation des AG, bien que le rôle de cette dernière dans la programmation de la NAFLD ne soit pas uniforme dans les études sur modèles animaux (L M Nicholas et al. 2016; M. Li et al. 2015). Chez le macaque, le rapport AG oméga-6/oméga-3 plasmatique est augmenté chez la mère sous régime HFD, ce qui peut modifier la composition lipidique du cerveau en développement chez son petit (Grant et al. 2011). Dans ce même modèle, une augmentation des comportement agressifs ou anxieux associé à une diminution d'activité du système sérotoninergique, est également observé (E. L. Sullivan et al. 2010). Par ailleurs, chez la souris, ce profil en AG maternel est associé à une NAFLD liée à des dysfonctions mitochondriales dans l'oxydation des AG, impliquant une diminution de la régulation par PPAR $\alpha$  (Pathil et al. 2015).

Une diminution de la régulation PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 $\alpha$ , est aussi constatée chez des agneaux exposés à une obésité maternelle périconceptionnelle. Cela entraîne l'augmentation de l'abondance d'AMPK, qui peut limiter initialement l'impact de ces changements de régulation PPAR $\alpha$  sur l'oxydation des AG (Lisa M. Nicholas et al. 2014). De plus, chez ces agneaux, l'expression de *Srebp1*, un important gène lipogénique, est augmentée. (L M Nicholas et al. 2016). L'accumulation lipidique au stade fœtal pourrait donc venir de l'association d'une augmentation de lipogenèse *de novo*, des apports maternels en AG, d'une incapacité ou d'un défaut d'oxydation des AG. Ensemble, ces altérations peuvent expliquer la susceptibilité à accumuler des lipides et la progression de la NAFLD en NASH à l'âge adulte, quand les individus sont exposés eux-mêmes à un régime hypercalorique (**Figure 25**) (L M Nicholas et al. 2016; Wesolowski et al. 2017). Chez les fœtus présentant un retard de croissance fœtale, il est constaté une diminution de l'activation de protéines sensibles aux nutriments, ce qui permet d'éviter l'apoptose des hépatocytes, mais contribue à

l'inflammation hépatique, la dyslipidémie et la diminution des réponses à l'insuline (Posont et Yates 2019).

### **Dysfonctions mitochondriales**

Plusieurs modèles ont mis en évidence un rôle des dysfonctions mitochondriales dans la pathogenèse de la NAFLD, plusieurs d'entre elles soulignent l'importance de l'augmentation du stress oxydant associée à des marqueurs de dommages oxydatifs (C. Lynch, Chan, et Drake 2017). En cas d'accumulation excessive de lipides intra-hépatiques, l'oxydation des AG par les mitochondries conduit à une augmentation des produits d'oxydation, principalement des dérivés réactifs de l'oxygène (**ROS** pour *reactive oxygen species*). En temps normal, la chaîne respiratoire mitochondriale se charge de détoxifier les cellules des ROS. Cependant, l'augmentation de l'oxydation mitochondriale peut progressivement créer un cercle vicieux, incluant une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, une surproduction de ROS et des dommages à l'ADN mitochondrial. Ce déséquilibre en faveur de la production de ROS est défini en tant que stress oxydant. Son association à une modification d'expression de gènes hépatiques liés à la fibrose, l'inflammation ou au stress oxydant, indique une lipotoxicité (**Figure 25**) (M. Li et al. 2015; Wesolowski et al. 2017).

Le stress oxydant participe à la mort cellulaire, à l'inflammation et à la fibrose. Il joue ainsi un rôle significatif dans la progression de la stéatose hépatique. Dans les modèles animaux d'obésité maternelle, des dysfonctions mitochondriales associées au stress oxydant sont observées chez les descendants. L'activité de composants essentiels de la chaîne respiratoire mitochondriale, le nombre de copies d'ADN mitochondrial hépatique, les niveaux d'ATP et la concentration en enzymes antioxydantes, telle que la glutathione peroxydase 1, sont diminués, en amont du développement d'une résistance à l'insuline (M. Li et al. 2015; C. Lynch, Chan, et Drake 2017; Baker et Friedman 2018). L'excès en AG fœtaux non-oxydés entraîne une augmentation d'intermédiaires d'acyl-CoA, ce qui peut altérer le métabolisme cellulaire via une augmentation du stress cellulaire, de l'inflammation et une diminution des fonctions mitochondriales. Ensemble, ces altérations peuvent limiter la biogenèse mitochondriale, bien que les mécanismes de programmation sous-jacents ne soient pas totalement compris (Wesolowski et al. 2017). Certains de ces mécanismes semblent impliquer des médiateurs clés de l'inflammation, en particulier une augmentation de la leptine circulante, une altération de l'expression du récepteur Tlr4 (pour *toll-like receptor 4*), important dans l'activation des cellules de Kupffer) et une augmentation d'expression de Tnf $\alpha$

(**Figure 25**) (C. Lynch, Chan, et Drake 2017). De plus, l'obésité maternelle préconceptionnelle est associée à une augmentation de l'activité mitochondriale et du stress oxydant dans les oocytes et les zygotes, chez la souris (Igosheva et al. 2010). Puisque les mitochondries sont presque exclusivement transmises par la mère, il est possible que les dysfonctions mitochondriales des descendants soient dues à la combinaison des altérations mitochondriales maternelles et de l'exposition à un environnement sub-optimal lors du développement précoce (M. Li et al. 2015).

## **Inflammation**

Les médiateurs inflammatoires ont un rôle critique dans la pathogenèse de la NAFLD, par exemple, le niveau d'expression de *Tnf $\alpha$*  est corrélé avec la sévérité de la NASH tandis qu'une réduction de *TNF $\alpha$*  par la metformine améliore le phénotype hépatique des souris *ob/ob*. De plus, les hépatocytes endommagés relarguent des « signaux de danger » (**DAMPs** pour *damage-associated molecular patterns*), promoteurs de processus pro-inflammatoires (M. Li et al. 2015).

Le RE est un organe important dans la synthèse et l'export des lipides et des protéines. La perturbation de son homéostasie contribue à la NAFLD et à sa progression en NASH. Différents éléments suggèrent que le stress du RE est associé à la lipogenèse *de novo*, aux dysfonctions mitochondriales, au stress oxydant, à l'inflammation et à la mort cellulaire (**Figure 25**) (M. Li et al. 2015).

Des mécanismes impliquant les macrophages sont aussi envisagés étant donné qu'en cas de NAFLD une infiltration est constatée dans le tissu hépatique, contribuant à l'inflammation locale et systémique, ce qui participe à l'inflammation placentaire et fœtale (M. Li et al. 2015). Étant donné le rôle hématopoïétique du foie fœtal, il est possible que la majorité des macrophages et des autres cellules circulantes de l'organisme proviennent du pool de CSH hépatiques fœtales. Une modification du microenvironnement des CSH pourrait ainsi altérer la programmation des macrophages résidents du foie, mais aussi ceux des autres tissus de l'organisme, y compris du tissu adipeux et de la moelle osseuse et ainsi contribuer aux réponses inflammatoires non-résolues observées dans un contexte d'obésité (**Figure 25**) (Wesolowski et al. 2017; Friedman 2018).

Le microbiote intestinal pourrait aussi avoir un rôle dans la programmation développementale du foie étant donné le dialogue qu'il entretient avec les cellules immunitaires. De multiples questions concernant les mécanismes de cette programmation restent néanmoins encore sans réponse (**Figure 25**) (Wesolowski et al. 2017).

### 3.2.2) Mécanismes épigénétiques de programmation hépatique précoce

Des études épigénétiques chez la souris montrent que l'exposition à la surnutrition maternelle est associée à des modifications de la méthylation de l'ADN et de certaines marques d'histones, visibles précocement et pouvant perdurer jusqu'à l'âge adulte. Une grande partie des gènes qui y sont associés sont liés au métabolisme mitochondrial ou à la régulation du métabolisme hépatique (Baker et Friedman 2018).

#### Méthylation de l'ADN

Plusieurs études sur différents modèles animaux et chez l'être humain, ont identifié une augmentation de méthylation de l'ADN au niveau de gènes codant pour les PPARs, des coactivateurs de PPARs ou FASN, chez les descendants de mères exposées à un régime HFD ou WSD en période périconceptionnelle, gestationnelle ou périnatale (M. Li et al. 2015; Wesolowski et al. 2017). Chez la souris, une perte de poids maternelle préconceptionnelle est associée à une augmentation de l'expression placentaire de *Mecp2* et *Mbd5*, deux « readers » de la méthylation de l'ADN, impliqués respectivement dans le développement de l'obésité et dans l'homéostasie du glucose (Panchenko et al. 2016). Chez l'être humain, l'augmentation de la méthylation du promoteur du gène de PGC-1 $\alpha$  est accompagnée d'une diminution de son l'expression, associée à une diminution de la biogenèse des mitochondries et à une résistance à l'insuline chez les patients présentant une NAFLD (Sookoian et al. 2010). Cependant, les gènes cibles et les modifications épigénétiques menant à la stéatose et la fibrose ne sont pas totalement identifiés (Wesolowski et al. 2017).

#### Modifications post-traductionnelles des histones

Différentes études rapportent des modifications des marques épigénétiques ou de la machinerie épigénétique.

Chez le macaque, le régime HFD maternel induit une NAFLD fœtale et module l'activité de Sirt1, un important senseur du métabolisme cellulaire, possédant une activité désacétylase des protéines histones et non-histones. L'exposition *in utero* au régime HFD, indépendamment de l'obésité maternelle, accroît l'acétylation de H3K14 de manière concomitante à une diminution d'expression et d'activité de SIRT1. Cela est associé à une altération de l'expression de plusieurs gènes importants pour les fonctions métaboliques et mitochondriales, dont celle des PPARs, FASN, Cyp7a1 (enzyme intervenant dans le

métabolisme du cholestérol) (Suter et al. 2012). Une autre étude chez le macaque a mis en évidence, dans le foie fœtal, une diminution d'expression de l'histone désacétylase HDAC1 associé à une hyperacétylation de H3K14 chez les descendants exposés au régime HFD maternel. Ces modifications sont associées à une augmentation d'expression hépatique de la rétinol déshydrogénase 12, un gène essentiel au contrôle circadien du mode alimentaire, ce qui pourrait conduire à un comportement alimentaire anormal (Aagaard-Tillery et al. 2008; C. Lynch, Chan, et Drake 2017).

Chez la souris, l'exposition *in utero* à un régime HFD est associée à une augmentation de marques répressives de la transcription, H3K14ac et H3K9me3, dans le foie fœtal et 5 semaines après la naissance. Ces modifications du code histone sont spécifiquement retrouvées dans les régions promotrices de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique, tels que *Ppara* et *Ppar $\alpha$*  (Suter et al. 2014). H3K14ac est une marque de promoteur ductile inactif dans une sous-population de cellules souches embryonnaires et est associé à la méthylation de H3K9, (Karmodiya et al. 2012; Jurkowska et al. 2017). Dans un autre modèle de souris, dans lequel les mâles ont été suivis sur trois générations sous régime HFD, il est constaté une diminution progressive de la méthylation de l'histone H3 entre la génération F0 et F2. Plus particulièrement, une diminution de H3K9me2 (une marque répressive) a été identifiée, en association à une augmentation progressive de l'expression de gènes de la voie de la lipogenèse et du stress du RE, tel que *Fasn* et *Srebp* (J. Li et al. 2012). Enfin, le régime HFD maternel entraîne une modification d'expression de plusieurs *Hdacs*, *Kats* et de *Brd2* dans le foie fœtal, tandis qu'une perte de poids maternelle préconceptionnelle est associée à une augmentation d'expression de ces gènes, intermédiaire entre les niveaux des individus de mères contrôles et obèses (Panchenko et al. 2016).

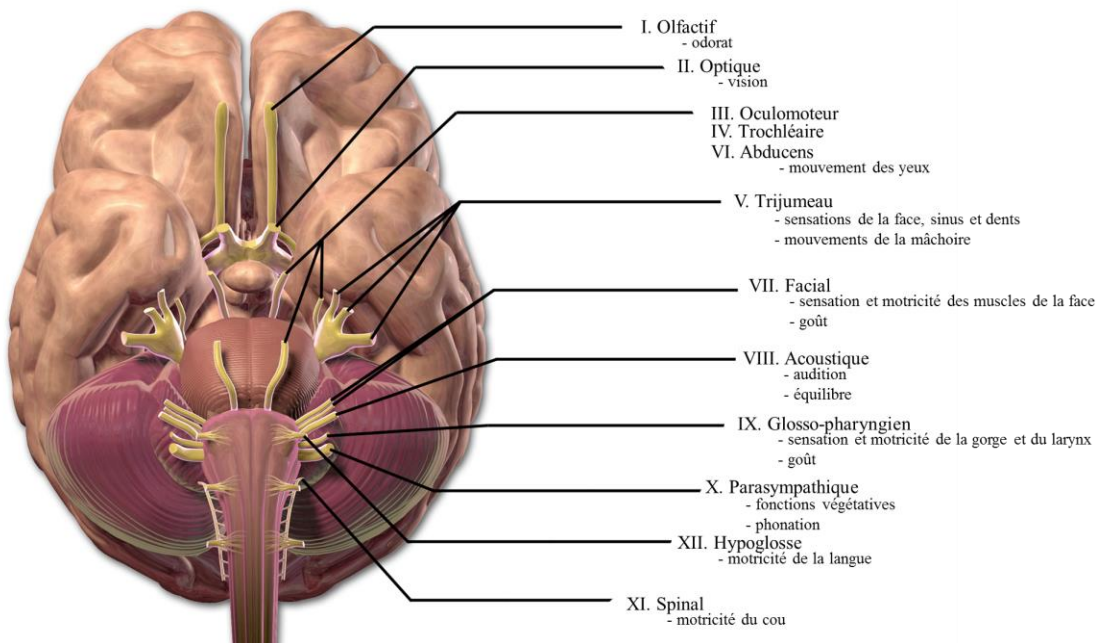
### **3.2.3) Mécanismes : conclusions**

La programmation ou le conditionnement développemental de la NAFLD implique plusieurs acteurs et mécanismes. L'exposition précoce à un environnement obésogène peut particulièrement altérer les fonctions métaboliques lipidiques et/ou glucidiques, via des défauts de transports de nutriments à travers le placenta ou encore une abondance d'AG dans la circulation fœtale. L'accroissement des réserves lipidiques intra-hépatiques, les dysfonctions mitochondriales, le stress oxydant et de faibles capacités antioxydantes peuvent affecter à court et long terme le métabolisme hépatique des descendants. Des mécanismes épigénétiques pourraient participer à la mémorisation de l'environnement métabolique



maternel délétère, dans l'oocyte et jusqu'au stade post-natal. Une large proportion de la littérature incrimine en particulier les défauts de programmation mitochondriale, qui augmentent les ROS et l'inflammation chez les descendants et favorisent le stockage de lipides dans le foie, du stade fœtal à l'âge adulte. L'exposition à un régime HFD au cours de la lactation ou en post-sevrage semble exacerber ces effets, tandis qu'une perte de poids ou un changement de régime maternel semblent améliorer le phénotype hépatique de la descendance, à court et long terme.

**Le métabolisme énergétique doit être régulé finement afin d'assurer toutes les fonctions, vitales ou non, d'un organisme. Le foie est un acteur important de cette régulation, en particulier dans la régulation de l'homéostasie énergétique via le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique. Néanmoins, cet organe n'est pas le seul à exercer un contrôle sur ces paramètres. Le cerveau, composé de cellules riches en lipides, est un des plus gros consommateurs de glucose de l'organisme. Il exerce donc un contrôle de l'homéostasie glucidique et lipidique important. Afin d'assurer des apports nutritionnels optimaux, le foie et le cerveau sont en dialogue constant.**



**Figure 26. Représentation des douze paires de nerfs crâniens émergents de l'encéphale ainsi que leurs fonctions respectives**

Les douze paires de nerfs émergents du crâne permettent l'accomplissement de la majorité des fonctions de l'organisme. Seuls les nerfs olfactifs et optiques émergent du cerveau. Les dix autres paires émergent du tronc cérébral.

Adapté de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen\\_0284\\_CranialNerves.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0284_CranialNerves.png)

# Chapitre III : Trajectoires pondérales maternelles et leur impact cérébral

## 1) Cerveau et métabolisme

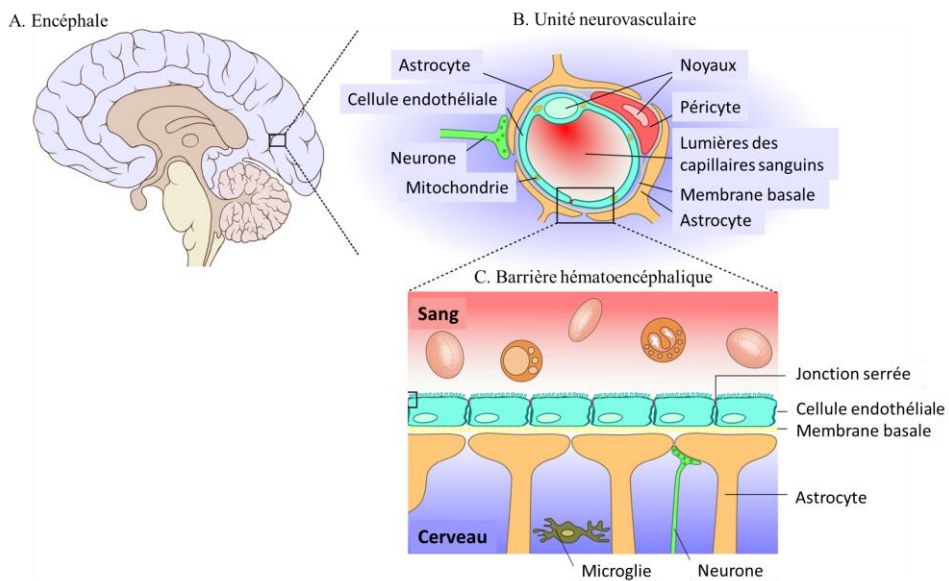
### 1.1) Morphologie et organisation fonctionnelle cérébrale à l'âge adulte

Le système nerveux est composé du système nerveux périphérique et du SNC, ce dernier regroupant l'encéphale et la moelle épinière. L'encéphale comprend le tronc cérébral, le cervelet et le cerveau.

Le cerveau est un organe vital, nécessaire pour intégrer et commander les interactions entre l'individu et son environnement. Cet organe assure quatre fonctions essentielles : motrices, sensibles, sensorielles et associatives. Ce sont les associations entre les informations reçues par les différentes zones fonctionnelles ainsi que leur intégration et leur traitement qui permettent la reconnaissance et l'action sur l'environnement (Outrequin et Boutillier 2007).

Le cerveau est un organe d'une grande complexité tant au niveau organisationnel que fonctionnel. Au niveau morphologique, le cerveau est constitué par deux hémisphères séparés par le sillon inter hémisphérique, et constitué de 5 lobes, permettant de distinguer les aires assurant les grandes fonctions cérébrales (vision, langage, motricité, comportement, mémoire, etc.). Chacune de ces aires comporte plusieurs structures nécessaires à la réception, l'intégration et le traitement des informations périphériques ainsi qu'à la réponse à ces informations. En particulier, le lobe limbique joue un rôle dans l'olfaction, la mémoire et la régulation des émotions et exerce une influence sur le système endocrinien (organes sécréteurs d'hormones). Toutes les zones qui le constituent sont situées vers la base du cerveau, autour du thalamus : septum, fornix, hippocampe, amygdale, cortex insulaire et fronto-orbitaire postérieur. Certains y ajoutent l'hypothalamus.

Les fonctions motrices, sensibles et sensorielles d'un organisme sont permises par la présence des douze paires de nerfs crâniens. La majorité de ces nerfs émergent du tronc cérébral (du IIIème au XIIème) tandis que les nerfs optiques et olfactifs émergent respectivement du chiasma optique via le trou optique et du bulbe olfactif via la lame criblée de l'ethmoïde (**Figure 26**).



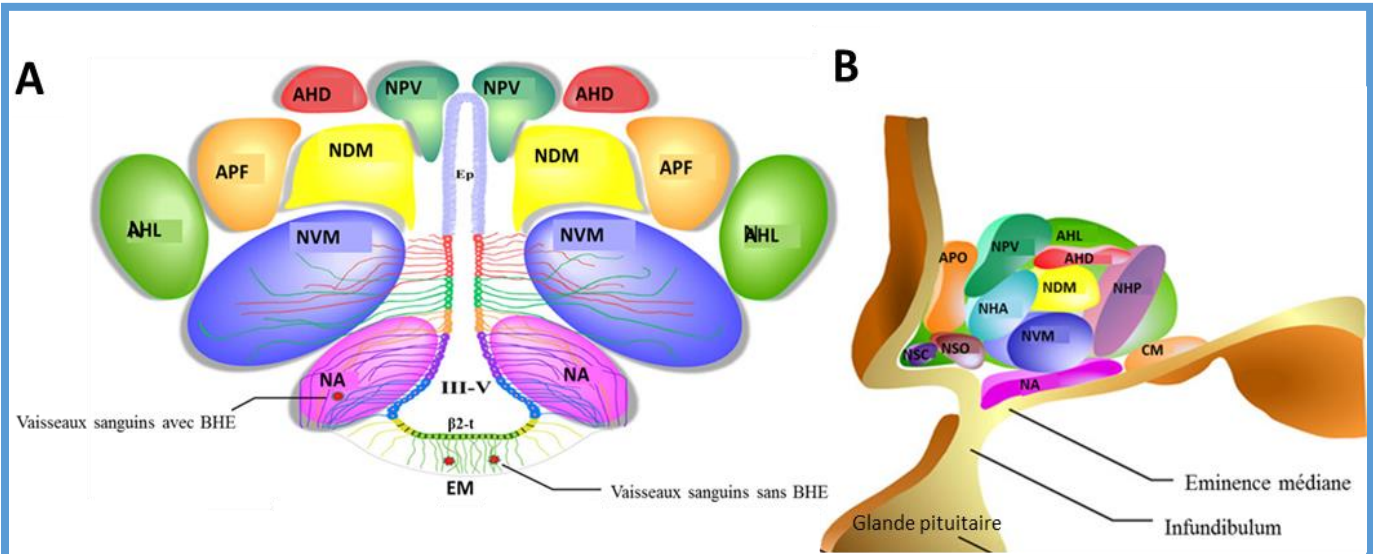
**Figure 27. Représentation schématique de l'encéphale (A), d'une unité neurovasculaire (B) et de la barrière hématoencéphalique (C).**

L'échange de molécules entre le sang et le cerveau est contrôlé par les unités neurovasculaires, qui forment la barrière hématoencéphalique.

Adapté de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blood-brain\\_barrier\\_02.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blood-brain_barrier_02.png)

Le cerveau est protégé des atteintes extérieures grâce à un système de protection très complet : plusieurs enveloppes, les méninges, limitent les infections; la boîte crânienne et sa loge fibreuse, protège des chocs; le liquide cébrospinal (**LCS**) circulant dans les ventricules, assure le maintien de la pression, une fonction de transport des hormones et nutriments, et l'évacuation des molécules et déchets du cerveau. Pour fonctionner normalement, le cerveau est dépendant d'apports optimaux en substrats énergétiques, principalement l'oxygène et le glucose. Le transport et l'apport de ces substrats est permis par une perfusion cérébrale finement régulée. Cette microcirculation dépend de l'action coordonnée de neurones, astrocytes, cellules endothéliales vasculaires, péricytes, cellules périvasculaires, cellules musculaires lisses et de la matrice cérébrovasculaire. Ces éléments constituent un ensemble fonctionnel appelé unité neurovasculaire, structure principale de la barrière hémato encéphalique (**BHE**) et assurant la surveillance immunitaire du cerveau, ainsi que la production de facteurs de croissance nécessaires à la survie des cellules cérébrales et des capillaires sanguins (**Figure 27**).

Le SNC joue un rôle majeur dans la gestion des réserves énergétiques et la régulation du métabolisme. En permanence, il reçoit de la périphérie des informations sur le statut énergétique et les intègre afin d'ajuster les paramètres physiologiques de l'organisme. Ces signaux peuvent provenir de l'environnement sensoriel, en particulier par le biais des récepteurs olfactifs ou des photorécepteurs, ou bien de l'organisme lui-même, entre autres au travers des régulations endocriniennes. La source principale d'énergie pour le cerveau sont les glucides, principalement le glucose qui est une source d'énergie immédiate et qui sert de molécule de signalisation sur l'état de la balance énergétique pour les neurones dits glucosenseurs. Par ailleurs, les nutriments présents dans la circulation sanguine informent le système nerveux central de l'état alimentaire de l'organisme, par exemple au niveau de l'hypothalamus, en traversant la BHE pour pouvoir directement modifier le comportement alimentaire (Berthoud et Morrison 2008). Les acides gras transportés sous forme de lipoprotéines sont également impliqués dans le fonctionnement neuronal par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA (Migrenne, Magnan, et Cruciani-Guglielmacci 2007). Parmi les structures impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique, l'hypothalamus et le bulbe olfactif sont particulièrement importants. L'**hypothalamus** est une structure centrale de la réception, de l'intégration et de la réponse aux signaux externes et internes à l'organisme. Les signaux lumineux ainsi que nutritifs modulent l'activité de différents noyaux hypothalamiques et permettent la régulation de l'homéostasie énergétique en modulant les apports et les dépenses énergétiques (Sollars et Pickard 2015). Les signaux olfactifs, perçus par le **bulbe olfactif**,



**Figure 28. Représentation schématique des noyaux hypothalamiques en coupe frontale (A) et sagittale (B)**

L'hypothalamus est constitué de différentes aires et noyaux hypothalamiques. Les échanges énergétiques avec le reste de l'organisme s'effectuent au niveau de vaisseaux sanguins pourvus ou non de BHE. Des échanges s'effectuent aussi via le LCS circulant dans les ventricules III-V au niveau des faces ventriculaire.

**NPV** – noyau paraventriculaire ; **AHD** – aire hypothalamique dorsale ; **NDM** – noyau dorso-médian ; **APF** – aire périfornicale ; **NHL** – noyau hypothalamique latéral ; **NHP** – noyau hypothalamique prémamillaire ; **CM** – corps mamillaire ; **NVM** – noyau ventromédial ; **NSC** – noyau suprachiasmatique ; **NSO** – noyau supraoptique ; **NHA** – noyau hypothalamique antérieur ; **NPO** – noyau préoptique ; **NA** – noyau arqué ; **EM** – éminence médiane ; **BHE** – barrière hémato-encéphalique ; **III-V** – troisième ventricule ;  **$\beta$ 2-t** -  $\beta$ 2-tanocytes ; **Ep** - épendymocytes

Adapté de Elizondo-Vega et al. 2015

influencent la préférence et la sélection alimentaire et, par conséquent, les apports énergétiques. De plus en plus de preuves attestent du dialogue entre les signaux d'homéostasie énergétique, le goût et l'odorat (MacLean et al. 2017).

L'étude de ces deux structures cérébrales a donc un intérêt particulier dans un contexte d'obésité afin de comprendre leur rôle respectif dans les défauts de gestion du métabolisme énergétique qui peuvent survenir.

## 1.2) Hypothalamus et métabolisme

### 1.2.1) Morphologie et organisation fonctionnelle de l'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure cérébrale dont les premières descriptions remontent au 16<sup>ème</sup> siècle. C'est une structure centrale de la réception, l'intégration et la réponse aux signaux externes et internes à l'organisme. L'hypothalamus assure des fonctions de contrôle des actions somatiques, des fonctions du système nerveux autonome, de la balance hydrique et de la soif, de la température corporelle et de l'expression des émotions. De plus, c'est une structure clé de la détection des nutriments circulants et du contrôle du métabolisme et de la balance énergétique, ou encore de la régulation de la sécrétion hormonale par les organes endocrines (C. McC. Brooks 1988).

L'hypothalamus peut être réparti en 3 zones (**Figure 28**) :

- La **zone périventriculaire**, formée par l'aire préoptique (**APO**), le noyau supra-chiasmatique (**NSC**), le noyau paraventriculaire (**NPV**), le noyau arqué (**NA**), et le corps mamillaire (**CM**) ;
- La **zone médiane**, formée par le noyau préoptique (**NPO**) médian, le noyau hypothalamique antérieur (**NHA**), le noyau ventromédial (**NVM**), le noyau dorsomédian (**NDM**) et le noyau hypothalamique prémamillaire (**NHP**) ;
- L'aire **hypothalamique latérale**, formée par le NPO latéral, le noyau hypothalamique latéral (**NHL**), et le noyau supraoptique (**NSO**).

L'hypothalamus est en contact avec le LCS au niveau de l'éminence médiane (**EM**), localisée dans l'hypothalamus médio-basal et dont le côté dorsal borde le troisième ventricule ce qui assure les échanges énergétiques entre le sang et le cerveau (Langlet 2014) (**Figure 28**). Les vaisseaux sanguins de l'EM ne forment pas de BHE, ce qui fait de l'EM un organe circumventriculaire, considéré comme «une fenêtre sur le cerveau» qui permet à



l'hypothalamus d'être un senseur direct de l'état métabolique au travers de la perception des niveaux des hormones et métaboliques sanguins. De plus, l'état nutritionnel d'un individu peut moduler la perméabilité de l'EM aux signaux métaboliques de la circulation générale (Elizondo-Vega et al. 2015).

Les connections entre l'hypothalamus et d'autres structures sont encore à l'étude de nos jours. La plupart des informations concernant l'hypothalamus et ses connections proviennent d'études sur des modèles animaux, leurs conclusions ne s'appliquent donc pas toutes à l'homme. Cependant, nous pouvons considérer que virtuellement, la majorité des fonctions corporelles y sont directement ou indirectement régulées (C. McC. Brooks 1988). De plus, il est clair que les neurones afférents de l'hypothalamus se projettent à plusieurs régions du cerveau bien que les interactions les plus étudiées concernent l'aspect endocrinien. Principalement, il sécrète des facteurs de régulation à destination de l'hypophyse via l'EM, puis le système porte hypophysaire, ce qui permet la sécrétion d'hormones qui contrôlent les glandes endocrines de l'organisme (Clarke 2014).

### **1.2.3) Hypothalamus et contrôle de la balance énergétique**

Ce sont les travaux pionniers de Hetherington/ Ranson et d'Anand/ Brobeck qui ont permis d'identifier l'hypothalamus comme le centre régulateur de l'appétit, contrôlant le métabolisme énergétique (Hetherington et Ranson 1942; Anand et Brobeck 1951). Au cours des vingt dernières années, son rôle est devenu de plus en plus clair de par son importance dans le maintien de l'homéostasie énergétique et du glucose (Dearden et Ozanne 2015).

Il y a actuellement 6 noyaux hypothalamiques clairement identifiés comme ayant un rôle dans la prise alimentaire et la dépense énergétique : le NA, le NSC, le NDM, le NPV, le NVM et les NHL (**Figure 28**). Le NA est le noyau sentinelle senseur du glucose et des hormones et sa proximité avec la circulation sanguine lui permet de mesurer les variations/pics de substances circulantes (Benyaich et Benyaich 2017). Cette structure possède deux types de neurones fonctionnellement différents : les neurones orexigènes à neuropeptide Y (**NPY**) et à « *agouti-related protein* » (**AgRP**) et les neurones anorexigènes à pro-opiomélanocortine (**POMC**). Ces derniers exercent leur action grâce à leur production d'hormone alpha stimulante de la mélanocortine ( **$\alpha$ -MSH** pour *alpha-stimulating hormone*) et du neuropeptide transcrit et régulé par la cocaïne et l'amphétamine (**CART** pour *cocaine and amphetamine regulated transcript*). Ces peptides activent les récepteurs 3 et 4 à la mélanocortine (**MC3-R et 4-R**) de leurs nombreuses cibles neuronales, ce qui entraîne une



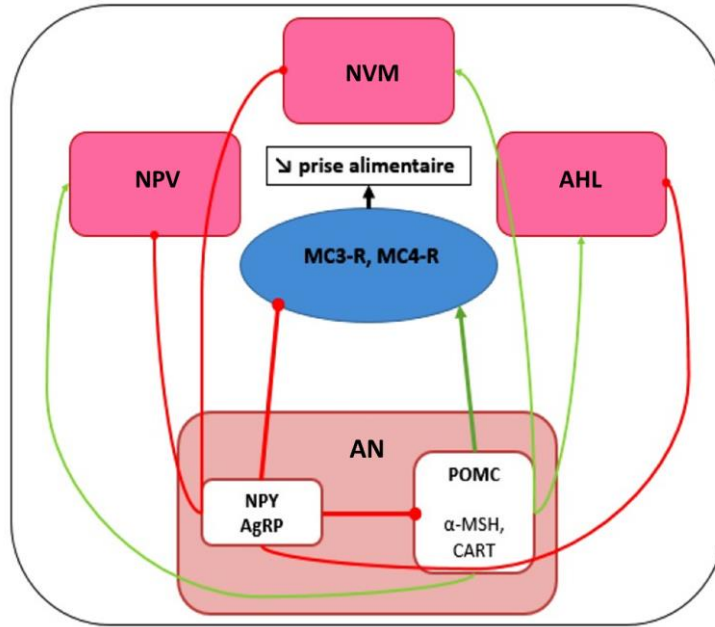


Figure 29. Système de régulation de la prise alimentaire par les neurones oréxigéniques (NPY/AgRP) et anoréxigénique (POMC).

Les traits rouges représentent des signaux oréxigéniques, tandis que les traits verts représentent des signaux anoréxigéniques. Les neurones NPY inhibent les neurones POMC. **NVM** - noyau ventromédial ; **NPV** - noyau paraventriculaire ; **AHL** - aire hypothalamique latérale ; **MC3-R** - récepteur 3 à la mélanocortine ; **MC4-R** - récepteur 4 à la mélanocortine ; **NA** - noyau arqué ; **NPY** - neuropeptide Y ; **AgRP** - « agouti related protein » ; **POMC** - proopiomélanocortine ; **α-MSH** - hormone alpha stimulante de la mélanocortine.

Adapté de Benyaich A. et K. 2017

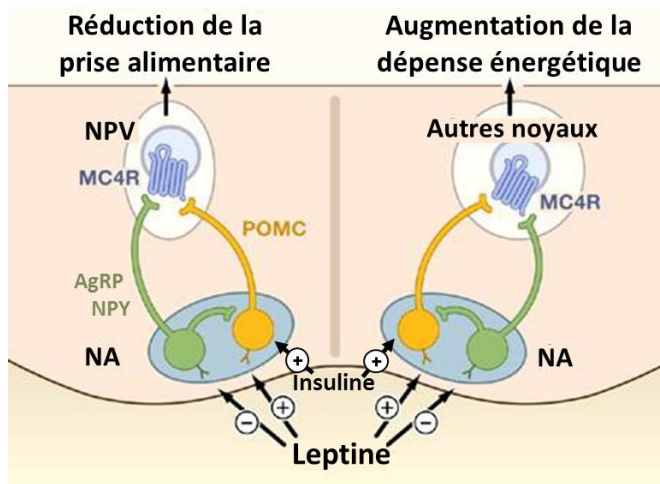


Figure 30. Effets de la leptine et de l'insuline dans le NA

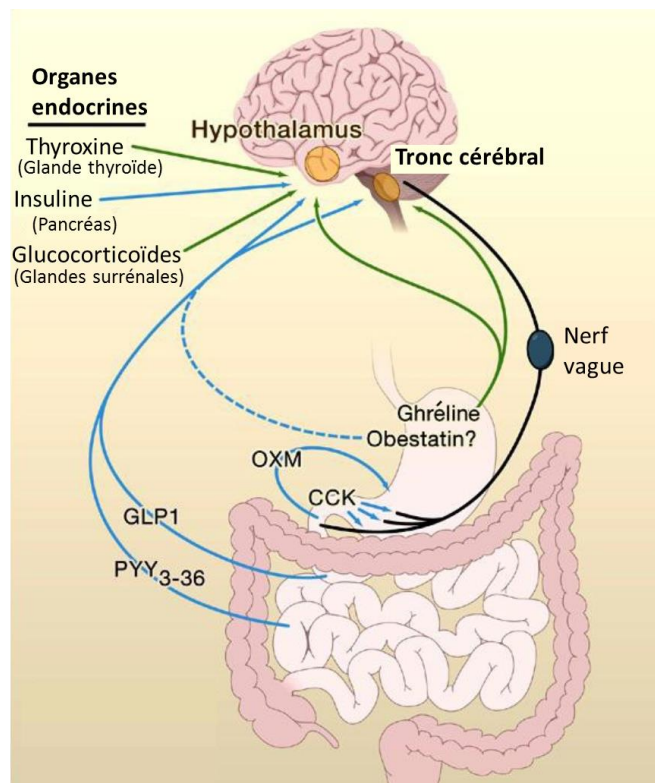
La leptine et l'insuline exercent leur action anoréxigénique en activant les neurones POMC, de plus, la leptine inhibe les neurones AgRP et NPY. Le signal est ensuite transmis au NPV, ce qui entraîne une diminution de la prise alimentaire, ou bien dans d'autres noyaux hypothalamique, ce qui entraîne une augmentation de la dépense énergétique.

Adapté de Benyaich A. et K. 2017

diminution de la prise alimentaire. Quant aux neurones NPY/AgRP, ils exercent un tonus inhibiteur sur les neurones POMC (**Figure 29**) (Luquet et Cruciani-Guglielmacci 2009).

Deux acteurs majeurs de cette régulation sont la leptine et l'insuline. Elles rendent compte des réserves énergétiques à long terme de l'organisme, liées au tissu adipeux pour la leptine et au fonctionnement pancréatique pour l'insuline. Leur principale fonction est l'ajustement de circuits neuronaux clés de la régulation de la balance énergétique. La leptine se fixe à ses récepteurs dans les noyaux de l'hypothalamus (NA, LHA, PVN), ce qui entraîne une diminution de l'apport alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (MacLean et al. 2017). L'insuline agit en activant les neurones POMC, tandis que la leptine agit en inhibant les neurones AgRP et en activant les neurones POMC (**Figure 30**) (Benyaich et Benyaich 2017). Certaines autres hormones sont produites au niveau du tractus gastro-intestinal et participent aussi à cette régulation. C'est le cas des hormones anorexigènes peptide YY3-36 et glucagon-like peptide-1, qui ont une action additive (Manning et Batterham 2014). Leur sécrétion se fait en réponse à l'ingestion de nutriments mais aussi en réponse à la présence d'acides biliaires (Penney et al. 2015). De manière opposée, la ghréline a un effet oréxigène et active des voies neuronales du contrôle homéostatique (tendance de l'organisme à maintenir ou à rétablir les différentes constantes physiologiques) et de la récompense (Müller et al. 2015). Plusieurs autres signaux périphériques participent à ce contrôle. Par exemple, l'hydroxybutyrate (un corps cétonique produit par le foie), accroît la prise alimentaire et l'expression de peptides oréxigéniques hypothalamiques. De plus, cela entraîne une augmentation transitoire de l'insulinémie et une diminution de la néoglucogenèse hépatique (Carneiro et al. 2016). D'autres signaux proviennent des glandes endocrines (la thyroxine, produite par la glande thyroïde et les glucocorticoïdes produits par les glandes surrénales) et agissent via la circulation générale. Ils peuvent aussi provenir du tractus gastro-intestinal et agissent via la voie parasympathique : la cholecystokinine et l'oxyntomoduline (**Figure 31**). Enfin, l'implication de la masse maigre est évoquée, mais le manque de connaissances à ce sujet complique la vision globale du contrôle biologique de l'appétit (MacLean et al. 2017).

Ces différents acteurs participent à la régulation centrale de l'homéostasie énergétique à court et à long terme, en agissant sur la régulation de l'appétit et du comportement alimentaire en induisant la faim ou la satiété. L'hypothalamus est un organe circumventriculaire, une grande diversité de facteurs périphériques peut donc y pénétrer. Les stéroïdes sexuels et de stress tels que l'œstrogène, la testostérone ou encore les glucocorticoïdes peuvent passer facilement les capillaires sanguins grâce à leur caractère

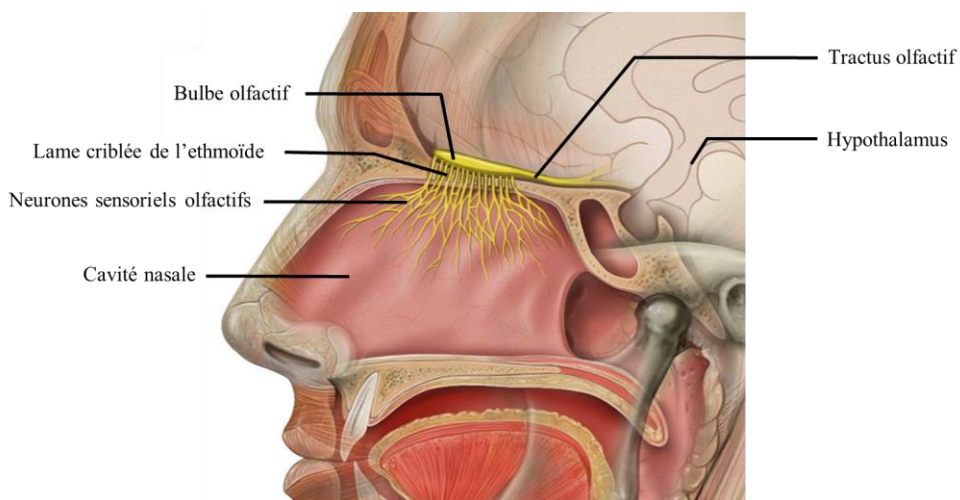


**Figure 31. Contrôle de l'homéostasie énergétique par les signaux périphériques**

Les signaux hormonaux dérivés de l'intestin et des organes endocriniens classiques, tels que le pancréas, la thyroïde et les glandes surrénales, agissent en synergie pour modifier les comportements alimentaires.

CCK – cholécystokinine ; OXM - oxyntomoduline; GLP-1 ; peptide 1 de type glucagon ; PYY<sub>3-36</sub> - peptide YY<sub>3-36</sub>.

Adapté de Benyaich A. et K. 2017



**Figure 32. Vue en coupe latérale du système olfactif et de l'hypothalamus**

Les molécules odorantes arrivant dans la cavité nasale se fixent sur des neurones olfactifs récepteurs spécifiques. L'axone des neurones activés transmet l'information électrique au bulbe olfactif en traversant la lame criblée de l'ethmoïde. Les signaux sont ensuite envoyés aux centres cérébraux olfactifs via le tractus olfactif afin d'être intégrés.

A proximité se trouve l'hypothalamus, structure cérébrale centrale du contrôle de l'homéostasie énergétique et des comportements alimentaires

Adapté de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Head\\_olfactory\\_nerve\\_-\\_olfactory\\_bulb\\_en.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Head_olfactory_nerve_-_olfactory_bulb_en.png)

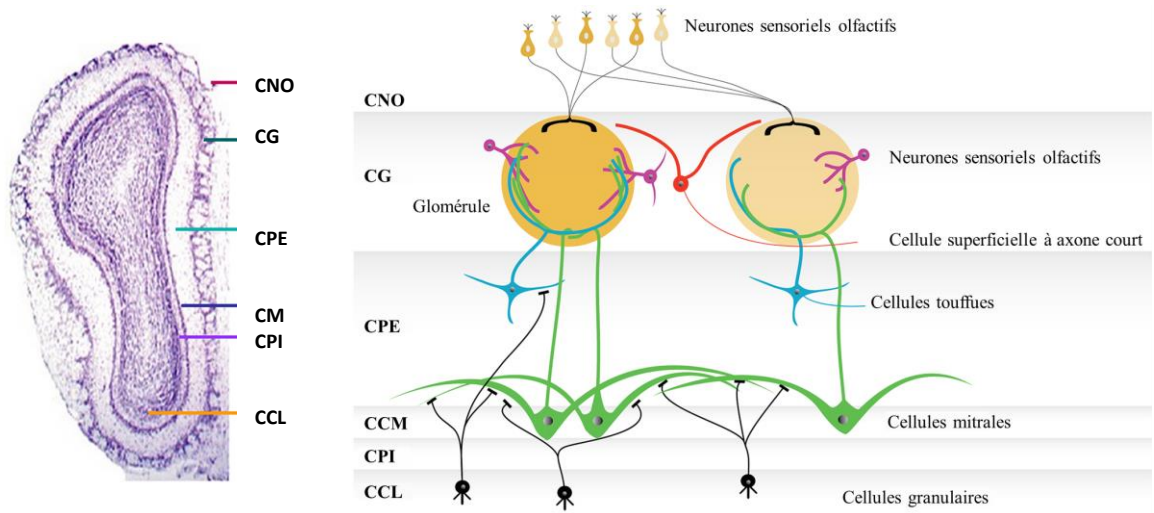
lipophile. Les peptides et hormones peptidiques sont d'importants facteurs de rétrocontrôle des cellules neuroendocrines de l'hypothalamus. Leur composition influe sur leur transport et le critère déterminant est leur lipophilie (Clarke 2014). Les hormones protéiques agissent sur l'hypothalamus. Par exemple, la prolactine régule positivement la sécrétion de dopamine par les neurones dopaminergiques du NA dans le système porte hypophysaire. L'entrée de ce type d'hormone peut se faire comme le glucose, par les tanocytes (cellules clés de l'interface hémato-hypothalamique, qui assurent les échanges entre le sang et le cerveau) à la base du troisième ventricule, mais aussi par l'hypothalamus médiobasal via l'EM (Clarke 2014). Les facteurs protéiques de taille plus importante, telle que la leptine (16 kilodaltons), peuvent être transportés de manière active et régulée au niveau des micro-vaisseaux, de manière facilitée via le LCS ou encore par les capillaires fenêtrés de l'EM et ceux poreux du NA médio-basal (Clarke 2014).

### **1.3) Bulbe olfactif**

#### **1.3.1) Morphologie et organisation fonctionnelle du bulbe olfactif**

Le bulbe olfactif est une structure cérébrale antérieure centrale paire, responsable de la réception, l'intégration et la transmission des signaux olfactifs de l'environnement. Il est vascularisé, situé hors de la BHE et permet l'intégration nerveuse des signaux chimiques odorants en provenance de la muqueuse. De forme ovoïde, il est localisé à la base du lobe frontal, recouvrant la lame criblée de l'os éthmoïde (**Figure 32**). Le bulbe olfactif est composé de neurones, de fibres nerveuses afférentes et efférentes, de multiples interneurons, de microglie, astrocytes et vaisseaux sanguins. Les cellules du bulbe olfactif sont arrangées en six couches concentriques : la couche nerveuse, la couche glomérulaire, la couche plexiforme externe, la couche des cellules mitrales, la couche plexiforme interne et la couche des cellules granulaires (**Figure 33**). Le bulbe olfactif est alimenté toute la vie durant par des neuroblastes précurseurs en provenance du courant de migration rostrale, qui se différencient en interneurons granulaires ou périglomérulaires.

Depuis la muqueuse olfactive, où se fait la réception des molécules odorantes au niveau de récepteurs spécifiques portés par les neurones sensoriels, les axones se projettent vers les glomérules (Cummings et Belluscio 2008). Ces structures sphériques de 150-250  $\mu\text{m}$  de diamètre, organisées en simple ou double couche dont le nombre est estimé à un millier



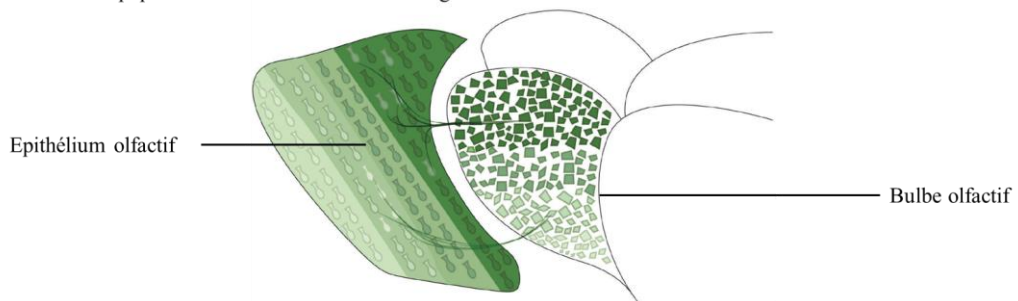
**Figure 33. Modèle simplifié du réseau neuronal du bulbe olfactif**

Cette représentation illustre la structure en couches concentriques du bulbe olfactif (à gauche) et le réseau neuronal de manière schématique où seules les structures participant à la transduction du signal olfactif sont représentées (à droite).

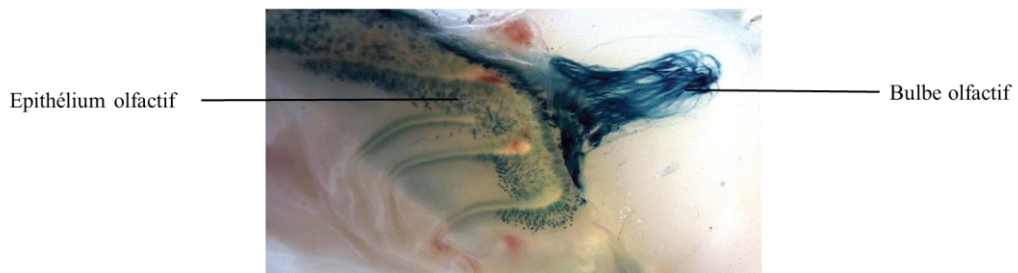
CNO - couche nerveuse olfactive ; CG - couche glomérulaire ; CPE - couche plexiforme externe ; CCM - couche des cellules mitrales ; CPI - couche plexiforme interne ; CCG - couche des cellules granulaires.

Adapté de Mori et al.1983 et Nagayama et al. 2014

A. Schéma des populations de neurones olfactifs et glomérules



B. Vue latérale du BO de la souris aM72-tau-LacZ.



**Figure 34. Régionalisation des populations de neurones sensoriels olfactifs dans l'épithélium olfactif et position correspondante des glomérules dans le bulbe olfactif**

A. Il existe une régionalisation progressive des différentes populations de NSO sur l'axe dorsopostérieur-ventroantérieur. La correspondance dorso-ventrale de la position glomérulaire est maintenue dans le BO.

B. Illustration des connexions entre les neurones M72 situés dans l'EO dorsopostérieur et le glomérule M72 dans la partie dorsale du BO. L'activité de la bêta-galactosidase (bleue) a été révélée par X-gal. NSO – neurone sensoriel olfactif, BO – bulbe olfactif, EO – épithélium olfactif

Adapté de Valle-Leija et al. 2015



chez l'humain, sont une composante fonctionnelle déterminante du système olfactif. En effet, selon un code combinatoire complexe, les axones des neurones activés par un odorant répartis sur toute la muqueuse convergent vers un ou deux glomérules uniques sur les deux-hémisphères. Ainsi, les signaux nerveux arrivant aux glomérules peuvent être considérés comme la représentation fonctionnelle de la réponse des différents récepteurs olfactifs, en respectant la topologie anatomique (**Figure 34**) (Valle-Leija 2015). La cartographie primaire d'une odeur se construit dans le bulbe olfactif via l'activation individuelle de différents neurones sensoriels olfactifs dont le nombre et la nature dépend de l'intensité et de la complexité de l'odeur. Une carte spatiale d'activation glomérulaire convergente, précise et stéréotypée est alors créée dans le bulbe olfactif. Les neurones assurant la sortie des informations du bulbe olfactif sont appelés neurones de second ordre et sont principalement constitués de cellules mitrales et à panache (ou touffues) (**Figure 33**). Les dendrites apicales de ces cellules sont influencées non seulement par les terminaisons nerveuses olfactives, mais aussi par des interneurons et des fibres centrifuges modulateurs, qui sont majoritairement GABAergiques (**GABA** pour acide  $\gamma$ -aminobutyrique) ou dopaminergiques (Doty 2009). Après avoir été modulé au niveau du bulbe olfactif, le signal exciteur est convoyé jusqu'au noyau olfactif antérieur, au cortex piriforme et à l'amygdale, qui à eux trois forment le cortex olfactif primaire. Des projections neuronales en sortie du cortex piriforme transmettent le signal jusqu'à différentes structures cérébrales desquelles fait partie l'hypothalamus. Ce réseau neuronal complexe détermine les performances olfactives individuelles et régule certains comportements liés à l'olfaction associés à la mémoire ou l'apprentissage par exemple (**Figure 35**) (Peng et al. 2019). Les projections du noyau olfactif antérieur, du tubercule olfactif et du cortex piriforme forment la composante hypothalamique des projections centripètes du système olfactif (Ennis, Hamilton, et Hayar 2007).

En retour, le bulbe olfactif reçoit une innervation de toutes les structures cérébrales sur lesquelles il se projette (**Figure 36**), en particulier de l'hypothalamus, qui nous intéresse ici pour comprendre les observations reliant balance énergétique et modulation de l'olfaction.

### **1.3.2) Bulbe olfactif et contrôle de la prise alimentaire**

Il est connu de longue date que les odeurs sont un puissant stimulant des choix et de la prise alimentaire, intervenant dans le déclenchement de la phase céphalique pour initier le repas, ou dans la satiété sensorielle spécifique pour limiter la consommation d'un aliment et favoriser la diversité au cours du repas (Yeomans et al. 2006). Des troubles chémo-sensoriels,

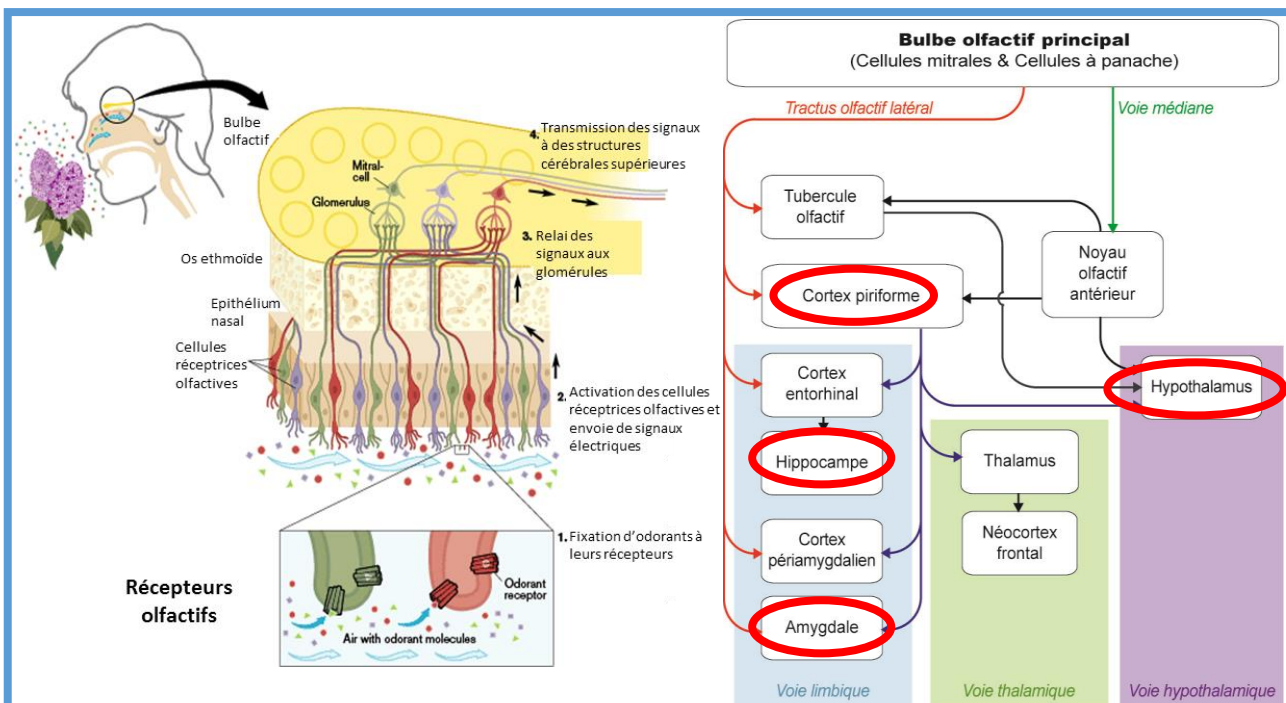


Figure 35. Voies de transduction des signaux olfactifs de la périphérie au SNC

Après la fixation de molécules odorantes à leurs récepteurs au niveau de la muqueuse olfactive, les signaux électriques sont transmis au bulbe olfactif pour être modulés avant leur transmission via des projections vers le système limbique (region impliquée dans la mémoire et le traitement des émotions), l'hypothalamus (structure de regulation de la balance énergétique) et le neocortex (region analytique).

Adapté de <http://odeurstpe.e-monsite.com/pages/plan/ii-du-nez-au-cerveau/1-le-systeme-olfactive.html>; et repris de la thèse de Pascaline Aimé, 2012 (<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00711645>)

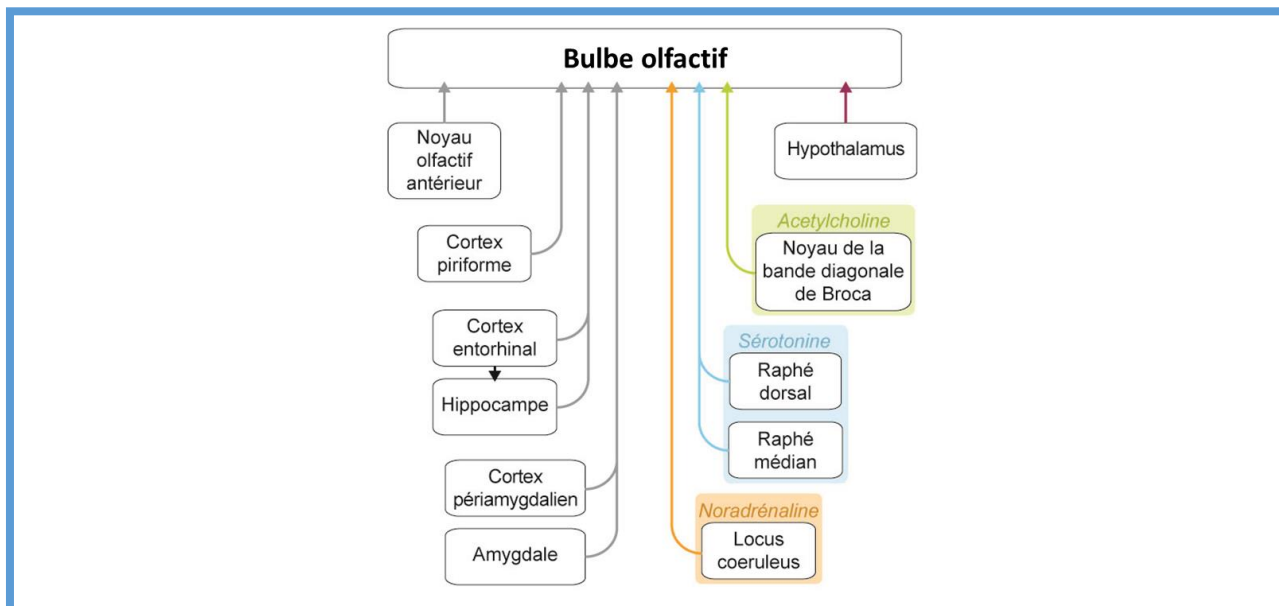


Figure 36. Projections centrifuges du SNC sur le bulbe olfactif

Représentation schématique des projections entre SNC et bulbe olfactif. Les rétroprojections des structures du SNC sur lesquelles se projette le bulbe olfactif sont figurées en gris. En couleur sont figurées les afférences noradrénergiques (orange), sérotoninergiques (bleu) et cholinergiques (vert) issues respectivement, du *locus caeruleus*, du noyau du raphé et du noyau de la bande diagonale de Broca, respectivement. Les projections hypothalamiques sont figurées en violet.

D'après Ennis et al. 2007, repris de Aimé 2012

en particulier olfactifs, qu'ils soient liés à une infection virale, une exposition à des produits toxiques ou des nanoparticules, un traumatisme crânien, l'âge, des troubles neurologiques tels que l'épilepsie ou des troubles neurodégénératifs (Doty 2009) sont à l'origine d'une altération de la qualité de vie, de modifications de l'appétit ou du poids et ont un impact défavorable sur la vie quotidienne ou le bien-être psychologique (Deems et al. 1991; Boesveldt et al., 2017).

Parmi les structures cérébrales impliquées dans le traitement des odeurs, le bulbe olfactif est d'une importance critique, puisqu'il est le premier relais d'intégration des signaux olfactifs. En effet, la bulbectomie chirurgicale, chez le rongeur, entraîne l'apparition de comportements dépressifs (C. Song et Leonard 2005) et des modifications du rythme des repas avec des effets sur le poids (Larue et Le Magnen 1972; Meguid, Gleason, et Yang 1993; Primeaux, Barnes, et Bray 2007), ce qui montre son importance dans l'homéostasie énergétique. La présence de récepteurs aux molécules de signalisation du métabolisme dans les diverses couches du bulbe olfactif illustre sa capacité à traiter aussi les informations périphériques métaboliques véhiculées sous forme d'hormones (Palouzier-Paulignan et al. 2012), mais aussi de nutriments (Julliard et al. 2017) qui parviennent dans cette région cérébrale par voie sanguine hors BHE. En effet, la surface des cellules bulbaires portent des récepteurs à la leptine, à l'insuline, à la ghréline ou aux endocannabinoïdes, qui modulent le signal électrique généré par les neurones. On trouve aussi des transporteurs du glucose, ainsi que des récepteurs aux acides aminés et aux acides gras, depuis le niveau des glomérules jusqu'aux cellules de la couche plexiforme interne, responsables de la modulation de l'information olfactive. Ceci permet au système olfactif de s'adapter rapidement à une modification aiguë de l'état physiologique en permettant une perception accrue des odeurs en cas de jeûne, par une réactivité plus importante des cellules relais du bulbe olfactif, ou diminuée en cas de satiété (P. Aimé et al. 2007; Prud'homme et al. 2009; Tong et al. 2011; Hanci et Altun 2016).

Il est donc naturel de considérer que toute modification du statut nutritionnel et ou métabolique de l'individu à long terme va aussi modifier la perception des odeurs dès le niveau périphérique (Palouzier-Paulignan et al. 2012). Chez l'être humain, de nombreux travaux ont exploré si les capacités olfactives (seuil de détection, mémorisation, discrimination) étaient modulées par une perturbation chronique de la balance énergétique, qu'elle soit positive (obésité) ou négative (perte de poids). Une méta-analyse récente a révélé que les facultés olfactives sont négativement corrélées avec l'IMC (Peng et al. 2019). Ainsi entre les personnes obèses et normo pondérées, la capacité à différencier des odeurs est différente : les normo pondérées atteignent de meilleurs résultats. Cependant, certains



résultats sont controversés, probablement parce que différentes molécules odorantes (odeurs de nourriture, ou pas) ont été utilisées pour les tests olfactifs. Cette revue systématique rapporte également que la chirurgie bariatrique, en particulier la sleeve gastrectomie (ou gastrectomie longitudinale), permet d'améliorer, voire de restaurer les facultés olfactives chez des patients obèses opérés (Van Vuuren et al. 2017).

Dans les modèles animaux, en particulier rongeurs, différents travaux montrent que le statut pondéral affecte la perception des odeurs, que les animaux soient génétiquement obèses ou que l'obésité résulte d'une alimentation déséquilibrée (Palouzier-Paulignan et al. 2012; Aimé et al. 2014; Badonnel et al. 2014; Lacroix et al. 2015). Une perte de poids, induite par une restriction alimentaire, modifie aussi la réponse aux odeurs (Badonnel et al. 2012). Il a par exemple été démontré, que des rats obèses nourris ont le même intérêt pour les odeurs que des animaux contrôles à jeun (Badonnel et al. 2014). Sur le plan mécanistique, les causes de ces observations comportementales peuvent être multiples. Une modification de l'expression des récepteurs et hormones métaboliques dans les tissus olfactifs est observée, ce qui pourrait faire varier le seuil de réponse des neurones olfactifs ou bulbaires. On note également une perte irréversible de neurones liée à une inflammation chronique des tissus olfactifs et/ou un déséquilibre dans les échanges énergétiques médiés par les transporteurs du glucose (Thiebaud et al. 2014; Lacroix et al. 2015). Enfin, plus indirectement, une activation de l'axe corticotrope liée au stress alimentaire et/ou énergétique pourrait participer à ces effets, les glucocorticoïdes modifiant la réponse aux odeurs chez l'homme (Hoenen, Wolf, et Pause 2017) comme chez l'animal (Raynaud et al. 2015).

De manière intéressante, un lien entre métabolisme énergétique et olfaction a été récemment mis en lumière chez la souris: une perte d'odorat pourrait atténuer les effets physiologiques délétères d'une alimentation obésogène. Une étude réalisée chez la souris démontre que la perte des neurones olfactifs, induite par manipulation génétique, ou une perte partielle d'odorat (hyposmie), à l'âge adulte, protège contre l'obésité induite par l'alimentation (Riera et al. 2017). Dans ce modèle, la masse grasse, mais aussi la résistance à l'insuline sont diminuées après la perte d'odorat. Ces effets sont aussi observés chez des souris intolérantes au glucose, malgré une alimentation HFD, ce qui suggère que la diminution des entrées olfactives rétablit la sensibilité à l'insuline (Riera et al. 2017). De plus, l'hyposmie est associée à une augmentation de l'activité nerveuse sympathique, résultant en une augmentation de la thermogenèse adipeuse (Riera et al. 2017). L'hyposmie serait liée à une augmentation de la dépense énergétique et à une diminution de la consommation alimentaire, ce qui atténue la majorité des effets négatifs associés au régime HFD. Leurs

résultats supportent l'idée que la diminution de l'olfaction déclenche une réponse métabolique et hormonale mimant l'arrêt de l'alimentation (Palouzier-Paulignan et al. 2012). Cela contribuerait à la régulation de la production de glucose hépatique par une action en amont sur les neurones du NA.

### **Interaction hypothalamus-Bulbe olfactif**

Certains travaux font un lien direct entre sensibilité olfactive et métabolisme via ses relations neuroanatomiques avec l'hypothalamus: le fait de sentir des aliments cachés, sans les consommer, modifie l'état d'activation de neurones POMC et à AgRP dans l'hypothalamus de manière transitoire (Y. Chen et al. 2015). De plus, il existe une sous-population de neurones olfactifs qui ont des interactions directes avec plusieurs noyaux hypothalamiques (Bader et al. 2012). Les signaux entrent dans le bulbe olfactif avant d'être transmis dans le cortex olfactif tout en envoyant des signaux indirects à l'hypothalamus, ce qui conduit à la notion de connectome, comme proposé pour les orexines/hypocrétines (orexigènes puissants) dont les fibres se projettent depuis l'aire hypothalamique latérale vers le bulbe olfactif (Gascuel et al. 2012).

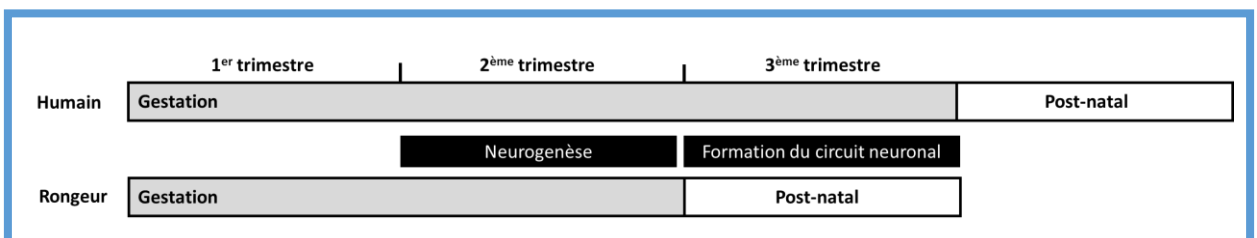
En résumé, le bulbe olfactif participe à la détection des nutriments et à la régulation du métabolisme énergétique par l'analyse de l'offre odorante. Des perturbations au cours du développement de cette structure sont donc susceptibles de perturber ces fonctions essentielles et favoriser des comportements alimentaires délétères, ce qui peut mener au développement de troubles métaboliques (Beauchamp et Mennella 2009). L'hypothalamus est un organe central dans le contrôle du métabolisme et de l'homéostasie énergétique et communique avec une grande majorité des tissus et organes du corps. Sa relative plasticité développementale suggère que des perturbations de son développement puissent conduire à des dysfonctionnements, ce qui pourrait contribuer à faire augmenter le risque de développement de troubles métaboliques à long terme (Dearden et Ozanne 2015).

## 2) Développement cérébral *in-utero*

### 2.1) Phases du développement précoce du SNC

Le cerveau se développe à partir de quelques cellules le long de l'ectoderme dorsal du fœtus, pour finalement être composé de plusieurs milliards de cellules précisément localisées, hautement spécialisées, et interconnectées, ce qui en fait une structure très complexe sur le plan de son organisation et de son fonctionnement. Pour y parvenir, de nombreux processus précisément contrôlés et finement régulés dans le temps (prolifération cellulaire, migration, différenciation, synaptogénèse, apoptose, myélinisation...) vont entraîner des modifications de l'architecture cérébrale aboutissant à la formation de circonvolution et sillons (Houston, Herting, et Sowell 2013). Brièvement et suite à la formation des feuilletts embryonnaires, la **période fœtale** se caractérise par le développement anatomique du cortex cérébral. Il se déroule en deux phases de migration neuronale : migration et translocation somale, puis migration gliale radiaire (Nadarajah et al. 2001). Si la majorité de la production neuronale et de la migration vers le cortex en développement a lieu avant la naissance, il est toutefois intéressant de noter qu'une neurogénèse, bien que limitée, continue en période post-natale, dans la zone sous-ventriculaire et sous-granulaire du gyrus denté. Tout au long de la vie, les neurones ainsi produits peuvent migrer vers le bulbe olfactif ou l'hippocampe, respectivement.

Bien que le développement cérébral ne semble pas totalement prédéterminé, les processus développementaux se produisent de manière ordonnée et suit un cheminement régulier au cours du temps. Les facteurs environnementaux et génétiques imposent alors des contraintes dirigeant le développement cérébral (Stiles et Jernigan 2010). Même s'il possède des capacités d'adaptation ou de régulation à des atteintes précoces, le cerveau reste néanmoins plus vulnérable qu'un système nerveux mature (Tilson 1998). Concernant spécifiquement sa protection, la BHE n'est mature que vers 6 mois après la naissance (Grandjean et Landrigan 2006), ce qui rend le cerveau fœtal moins protégé face à certains agents d'origine maternelle (Dorman et al. 2001).



**Figure 37. Comparaison du développement neuronal hypothalamique chez l'humain et les rongeurs.**

Chez l'humain, la neurogenèse et la formation d'une connectivité fonctionnelle s'effectuent au cours de la gestation. Chez les rongeurs, une connectivité synaptique complète n'est établie qu'au cours de la période post-natale. Les neurones hypothalamiques murins impliqués dans la régulation de l'équilibre énergétique apparaissent entre E12 et E16 et la connectivité fonctionnelle entre les différents noyaux de l'hypothalamus est établie au cours des quatre premières semaines de la vie postnatale.

Adapté de Dearden et Ozanne 2015

## 2.2) Phases de développement de l'hypothalamus

Chez l'être humain, la majorité de la neurogenèse, des migrations et des connections fonctionnelles sont établies avant la naissance. Chez la souris, la neurogenèse a lieu *in utero* et la formation du circuit neuronal principalement après la naissance (**Figure 37**) (Dearden et Ozanne 2015).

Chez la souris, différentes études utilisant des méthodes plus ou moins sophistiquées (marquages à la thymidine, bromodeoxyuridine, FISH) ont démontré que les différentes structures se forment entre E11 et E16, avec différentes périodes de génération neuronale (Dearden et Ozanne 2015). Chez l'humain, un article de 2003 a mis en évidence différentes phases de développement de l'hypothalamus. Il est segmenté en trois parties distinctes selon leur localisation et leur durée de développement : la zone latérale, le cœur et la ligne médiane. La zone latérale est la première à se former, autour de 9-14 semaines de grossesse, suivi de la formation du cœur (essentiellement des projections internes) entre 15 et 23 semaines de grossesse. Les structures de la ligne médiane sont les dernières à se former, après 34 semaines de grossesse (Koutcherov, Mai, et Paxinos 2003).

Une étape critique du développement hypothalamique est la génération des neurones du NA et leurs connections, étant donné leur rôle clé dans le circuit de la régulation de la balance énergétique. Chez les rongeurs, ces connexions sont formées après la naissance, du stade P2 à P18, avec tout d'abord une présence de fibres neuronales NPY+ dans le tronc cérébral à partir de P2. S'en suit une connexion entre NA et NPV via des projections vers ce dernier, suivi d'une innervation par des neurones NPY+ (Dearden et Ozanne 2015). Chez le macaque, le développement de projections NPY+ a lieu au cours du 3ème trimestre de gestation, bien que la densité de ces projections soit moins importants qu'à l'âge adulte, suggérant un raffinement de ces connexions au cours de la période post-natale (Grayson et al. 2006).

Au cours des stades de développements périnataux, il est impératif pour la descendance de maintenir une balance énergétique positive afin d'assurer une croissance adéquate. Le rétrocontrôle homéostatique des apports énergétiques commence donc plus tard que la période post-natale. Chez le rongeur, le rôle paradoxal des voies impliquées dans l'homéostasie énergétique lors du développement précoce reflète la plasticité hypothalamique. Les signaux NPY et POMC provenant du NA sont intégrés par le NPV qui peut ainsi réguler l'homéostasie énergétique. Différents exemples attestent de la flexibilité de ces connexions.

Au cours des 3 semaines suivant la naissance, une transition développementale s'effectue, certains neurones répondant au NPY changent et répondent ensuite à la mélanocortine (Melnick et al. 2007). Durant la période post-natale précoce, la leptine dépolarise les neurones NPY, tandis qu'à l'âge adulte, elle les hyperpolarise (Baquero et al. 2015).

Un recablage des neurones NPY a lieu au cours de la vie post-natale précoce. En particulier, une augmentation du signal GABAergique inhibiteur est constatée dans les neurones NPY du NA, jusqu'à 10 semaines après la naissance (Baquero et al. 2015). Le NPY est par ailleurs exprimé de manière transitoire dans le CNS de rongeurs, en dehors du NA, durant la période post-natale précoce. Cela suggère un possible lien avec le maintien de la balance énergétique positive. De plus Padilla et associés ont démontré qu'une population de neurones précurseurs POMC donne ensuite une population de neurones NPY oréxigéniques (Padilla, Carmody, et Zeltser 2010).

Ces différentes étapes et processus de mise en place de la régulation énergétique sont donc particulièrement importants et peuvent être sujets à une programmation par le statut nutritionnel de la mère ou de la descendance.

En ce qui concerne les primates, les informations à ce sujet sont très peu nombreuses. Néanmoins, la haute conservation des fonctions des différentes régions de l'hypothalamus, entre rongeurs et "organismes supérieurs", suggère que plusieurs mécanismes développementaux peuvent être partagés (Dearden et Ozanne 2015).

### **2.3) Phases de développement du bulbe olfactif**

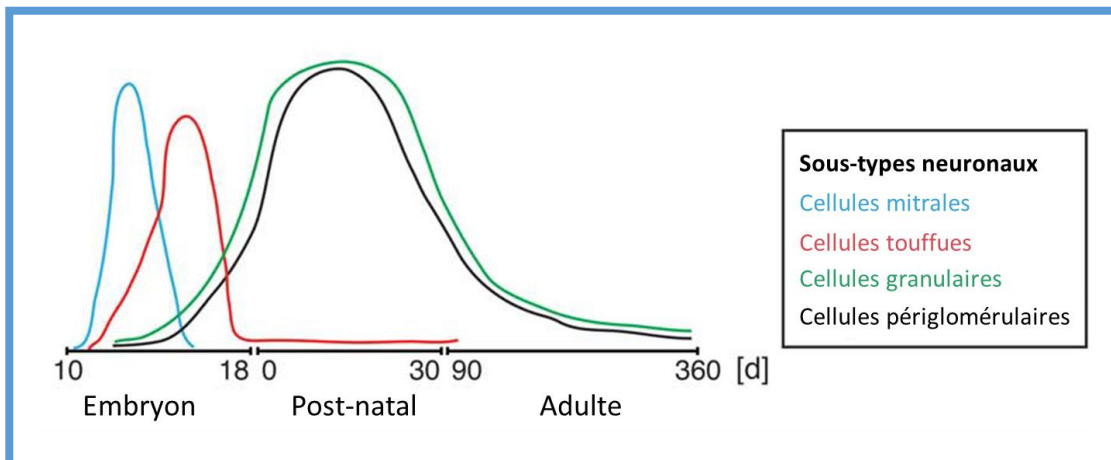
Chez l'**humain**, la faculté à discerner des saveurs est permise par la réception sensorielle des récepteurs olfactifs et gustatifs. Ces deux types de récepteurs sont présents à la 8<sup>ème</sup> semaine de grossesse et ont une apparence mature à la fin du 3<sup>ème</sup> trimestre (Bloomfield et al. 2017).

Peu d'études présentent le développement des neurones primaires des centres olfactifs chez l'humain étant donné la difficulté à accéder à des embryons ou des fœtus humains (Díaz-Guerra et al. 2013). Quelques synapses sont formées avant 23 semaines de grossesse et à 28 semaines, le marqueur de maturité des neurones olfactifs est détecté dans la muqueuse olfactive. A 30 semaines de grossesse, le bulbe olfactif montre des signes de fonctionnement et à 32-35 semaines le marqueur de maturité olfactive y est également détecté (Díaz-Guerra et al. 2013; Bloomfield et al. 2017). Sur le plan sensoriel, les narines du fœtus sont ouvertes dès

le cinquième mois de grossesse chez l'homme et le système olfactif est fonctionnel dès le dernier tiers de gestation, l'essentiel des systèmes neuromodulateurs étant déjà en place (Sarnat et Yu 2016; Sarnat, Flores-Sarnat, et Wei 2017).

Chez la **souris**, des structures ovales, appelées placodes olfactives, apparaissent à E9. Ces structures vont apporter la quasi-totalité de la population de neurones sensoriels olfactifs, tandis que l'épithélium olfactif s'invagine à E10 et des axones olfactifs en émergent, se rassemblent en un faisceau et se dirigent vers le pôle rostral des hémisphères cérébraux (Valle-Leija 2015; Bradley et Mistretta 1975). À E11, les prémices du bulbe olfactif sont visibles dans la région frontale du CNS et à E12 les axones olfactifs entrent en contact avec le bulbe olfactif en devenir (Valle-Leija 2015; Bradley et Mistretta 1975). Les cellules mitrales et les neurones touffus commencent à apparaître à E10.5 et leur génération se poursuit jusqu'à E15.5 et jusqu'à la naissance, respectivement. En revanche, le développement des interneurons, des cellules granulaires et des neurones périglomérulaires commence à E12.5 et continue tout au long de la vie post-natale (**Figure 38**). C'est entre E12.5 et E19.5 que s'effectue l'organisation, en couches, des cellules du bulbe olfactif (Díaz-Guerra et al. 2013). Les axones des neurones sensoriels olfactifs pénètrent la couche externe du bulbe olfactif à E16-E17, puis poursuivent jusqu'à la zone périglomérulaire, ce qui induit le développement des structures glomérulaires. Les processus de maturation des NSO et de maintenance de la carte glomérulaire sont complexes et dépendent des récepteurs (Valle-Leija 2015). Ainsi, les axones des neurones olfactifs forment rapidement des contacts synaptiques au niveau des glomérules au stade fœtal. Ainsi, les capacités de sensibilité, de mémorisation et de discrimination des odeurs sont déjà établies *in utero*, afin d'accompagner les comportements indispensables à la survie du nouveau-né, en particulier pour son alimentation (Logan et al. 2012; Al Aïn et al. 2013). Chez l'homme, à partir de la fin du premier trimestre de grossesse, le fœtus commence à avaler de petites quantités de fluide amniotique, montant jusqu'à 750 ml/jour en fin de grossesse. Les récepteurs olfactifs et gustatifs sont par conséquent exposés aux composants du fluide amniotique plusieurs semaines avant la naissance. Des composants de l'alimentation maternelle peuvent atteindre le fluide amniotique et ainsi devenir familiers au fœtus.

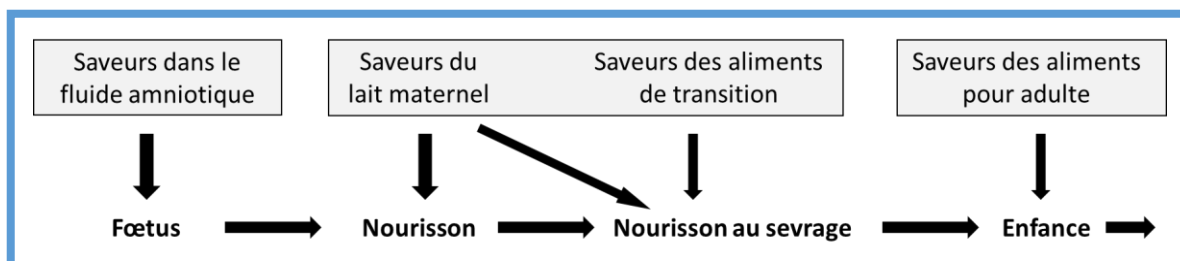
A la naissance, une maturation des systèmes neuromodulateurs va ensuite permettre d'affiner les capacités olfactives et guider les apprentissages en fonction de l'expérience maternelle et de l'environnement post-natal. Selon l'expérience ou l'apprentissage, la représentation neurale des odeurs sera modifiée à différents niveaux du circuit olfactif depuis la muqueuse (Kass et al. 2015), le bulbe (Kato et al. 2012; A. Liu et Urban 2017) ou le cortex



**Figure 38. Représentation schématique de la neurogenèse embryonnaire et adulte du bulbe olfactif chez la souris**

Les sous-types neuronaux sont générés au cours de fenêtre de temps bien définies. La large majorité des neurones de projection sont produits durant le développement embryonnaire, alors que la production des différents types d'interneurones s'effectue après la naissance et à l'âge adulte.

Adapté de Diaz-Guerra et al., 2013



**Figure 39. Points d'impact des expériences précoces du développement des préférences alimentaires**

Au cours de son développement précoce, un enfant rencontre généralement le même type de saveurs, dépendant principalement du régime maternel. Cette transition douce entre chaque type de régime alimentaire faciliterait le sevrage des descendants. L'utilisation de formules infantiles peut être considérée comme une rupture de cette transition douce.

Adapté de Beauchamp et al. 2009



piriforme (Wen Li et al. 2006; W. Li et al. 2008), ce qui démontre la plasticité extraordinaire du système de codage des odeurs, même chez l'adulte (S. V. Jones et al. 2008). Les enfants nés à terme gardent en mémoire les composants volatiles ou sapides présents dans le fluide amniotique, durant la période post-natale et au-delà (Bloomfield et al. 2017). L'alimentation maternelle au cours de la grossesse et de la lactation influera directement sur l'établissement des préférences alimentaires, l'acceptation et l'appréciation de la nourriture au moment de la transition à une alimentation solide (**Figure 39**).

### **3) Effet de l'environnement maternel nutritionnel sur le développement fœtal**

#### **3.1) Effets de la physiologie maternelle sur le développement cérébral**

Le développement cérébral peut être sensible à deux types d'environnement : intra-utérin et post-natal. Ces deux environnements sont hautement influencés par le régime maternel et son statut métabolique. De nombreux modèles animaux ont fourni des preuves que la nutrition périnatale a un impact à plus ou moins long terme sur la physiologie et le comportement de la descendance, étendant le concept de DOHaD à la sphère cérébrale. En effet, plusieurs facteurs associés à l'obésité maternelle, telle que l'inflammation chronique, l'hyperlipidémie, l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, sont associés chez la descendance, à une augmentation des risques de troubles alimentaires, d'anxiété, de dépression, de déficit de l'attention, d'hyperactivité, et de troubles du spectre autistique (Bolton et Bilbo 2014; E. L. Sullivan et al. 2015; Edlow 2017).

Chez l'humain, l'obésité seule est associée à ces troubles comportementaux, mais accroît aussi la susceptibilité à développer des troubles neurodégénératifs, comme la maladie d'Alzheimer, ou la maladie de Parkinson. En plus de l'obésité, les facteurs socio-économiques et le comportement maternel peuvent influencer sur le développement de troubles dans les interactions sociales ou un renfermement sur soi-même chez les enfants (E. L. Sullivan et al. 2015; Edlow 2017).

Des différences significatives ont été observées dans la structure du cerveau et l'expression de ses gènes, chez les fœtus et les descendants de rongeurs rendus obèses par l'alimentation. Ces différences incluent (E. L. Sullivan et al. 2015; Edlow 2017) :

- Une diminution de la prolifération et de la maturation des cellules souche dans le 3<sup>ème</sup> ventricule, l'hypothalamus et le cortex cérébral au stade fœtal ;
- Des défauts de production neuronale et de la division des cellules progénitrices de l'hippocampe en période post-natale ;
- Au niveau de l'hippocampe : une diminution de l'apoptose cellulaire au stade fœtal, des défauts de production neuronale et de la division des cellules progénitrices en période post-natale, une augmentation de l'oxydation des lipides insaturés et des défauts de production de BDNF associés à une diminution de la production dendritique en période post-natale ;
- Une signature d'expression génique cérébrale fœtale présentant un dimorphisme sexuel, même en absence de consommation de régime HFD pendant la gestation ;
- Une augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif dans le cerveau fœtal ainsi qu'une dérégulation de la signalisation orexigénique, sérotoninergique et dopaminergique, voies clés du comportement, au niveau de l'hypothalamus et du cortex mésolimbique.

Les modèles de primates non humains ont été également étudiés sur le plan des atteintes liées au régime maternel, car ils présentent des modifications développementales cérébrales induites par la physiologie maternelle similaires à l'humain. De plus, ce modèle est le seul à présenter des troubles métaboliques et psychosociaux du même ordre que ceux observés chez l'humain (Friedman 2018). Chez le macaque à 1 an, après une exposition au régime maternel HFD au cours de la gestation et de la lactation, on observe une diminution du taux de sérotonine cérébral accompagné de comportements anxieux, agressifs et répétitifs (J. R. Thompson et al. 2017). Après le sevrage, il est aussi constaté une préférence pour les aliments riches en lipides et en glucides ainsi qu'une diminution de la signalisation dopaminergique dans le cortex préfrontal (Rivera, Christiansen, et Sullivan 2015). Certains de ces effets cognitifs ont été récemment décrits comme intergénérationnels (Sarker et Peleg-Raibstein 2018). Ainsi, l'environnement nutritionnel périnatal impacte le cerveau en développement avec des effets moléculaires et comportementaux.

Thème	Référence	Modèle	Facteur de stress	Phase du stress	Phase d'observation	Structure étudiée / Tests	Effets rapportés
Neurogenèse et nombre de cellules hypothalamiques	Chang et al 2008	Rat Sprague-Dawley	HFD maternel	P+G+L	G+PN	Hypothalamus	Neurogenèse accrue dans le 3ème ventricule au cours de la gestation. Augmentation de la migration neuronale de cette zone vers les autres zones de l'hypothalamus, phénotype orexigénique. Modification de l'expression de gènes en post-natal
	Harder et al., 2001	Rat Wistar	Hyperinsulinémie par injection	PN	PNW30	Hypothalamus	Malformation du NVM dû à diminution de formation et de taille de neurones
	Franke et al., 2005	Rat Wistar	GDM (streptozotocine) +/- transplantation d'îlots pancréatiques	G	S	Hypothalamus	Désorganisation et malprogrammation des systèmes neuroendocriniens orexigéniques et anorexigéniques
	Fahrenkrog et al., 2004	Rat Wistar	GDM	L	Ad	Hypothalamus	Malformation du noyau basal médian, possiblement dû à une diminution de formation de neurones
	Yu et al., 2014	Souris C57BL/6J	HFD maternel	P+G	NN	Cellules souches neurales cérébrales	Augmentation de l'expression de Msi1/2 et Notch 1 (gènes/protéines clés de la maturation des NSCs)
	Kim et al., 2016	Souris C57BL/6J	HFD maternel	G	Fœtal	Hypothalamus	Augmentation du nombre d'astrocytes
	Cardenas-Perez et al., 2018	Rat Wistar	HFD maternel	G	PNW9	Hypothalamus	Fusion de mitochondries et stress du réticulum endoplasmique
Connexions intra-hypothalamiques	Steculorum and Bouret, 2011	Souris C57BL/6	GDM	G	Ad	Hypothalamus	Disruption des projections axonales dans l'ARC --> diminution des projections des fibres neuronales AgRP et POMC de l'ARC vers le PVN
	Fahrenkrog et al., 2004	Rat Wistar	GDM	L	Ad	Hypothalamus	Perturbation dans le développement du circuit hypothalamique de la balance énergétique
	Vogt et al., 2014	Souris C57BL/6	Obésité maternelle	P+G+L	PNW8	Hypothalamus	Réduction des projections de l'ARC vers le PVN, DMN et hypothalamus latéral
	Sullivan et al., 2017	Macaques	HFD maternel	P+G+L	PNM13	Hypothalamus	Réduction de la quantité de fibres AgRP
	Schipper et al., 2013	Souris C57BL/6J	Régime post-sevrage (low o-6 / high o-3)	NN	PND28 et PND98	Hypothalamus	Diminution des projections anorexigéniques et orexigéniques de l'ARC vers le PVN
	Ferezou-Viala et al., 2008	Rat Wistar	HFD maternel	G	PNW9	Hypothalamus	Diminution de la phosphorylation de STAT3 sous l'action de la leptine
	Sanders et al., 2014	Souris C57BL/6	HFD maternel	G	E17.5	Hypothalamus	Diminution de l'expression de récepteurs à la Netrine sur les neurones NPY --> hyp : disruption de la signalisation Netrine (présent en gestation tardive) entraîne la diminution des projections de l'ARC vers le PVN
Expression de gènes et profils en neuropeptides	Collden et al., 2015	Souris C57BL/6	Surnutrition puis injections de ghreline	NN (PND12)	PND8 à PND60	Ghrelinémie	Résistance à la ghreline
	Chang et al., 2008	Rat Sprague-Dawley	Obésité maternelle +/- surnutrition	P+G+L	E14 à PN	Hypothalamus	Changement de l'expression de gènes lié à l'alimentation dans un état basal
	Page et al., 2009	Rat Sprague-Dawley	HFD maternel et/ou post-sevrage	P+G+L	Ad	Hypothalamus	LepR, POMC et NPY surexprimés, récepteur NPY sous exprimé
	Gout et al., 2010	Souris C57BL/6J	HFD maternel et/ou post-sevrage	G+L	E19.5, PND1, PND10, PND21, PNW8 et PNW16	Hypothalamus (F1 mâles)	Développement de troubles métaboliques associés à une altération de composants du système melanocortinergique hypothalamique, aggravation des effets si HFD post-sevrage mais effets réversibles en fonction du passage au régime contrôlé
	Dearden and Balthasar, 2014	Souris CD1	HFD maternel	G+L	PN	Hypothalamus - PVH	Modification de la régulation normale des gènes en réponse au statut métabolique
	Chen and Morris, 2009	Rat Sprague-Dawley	HFD maternel	P+G+L	PND19	Hypothalamus	Modification de la régulation normale des gènes en réponse au statut métabolique
	Chen et al., 2014	Rat Sprague-Dawley	HFD maternel et/ou post-sevrage	P+G+L+Ad	PNW9	Injection de glucose	Expression de NPY, POMC, mTOR, GLUT1, MCT2, MCT4 et LDHb diminuée en réponse à l'obésité maternelle. Expression de POMC diminuée et mTOR augmentée chez descendants sous HFD
	Poon et al., 2012	Rat Sprague-Dawley	Maternal HFD	G	E19	Hypothalamus	Identification de populations de neurones exprimant de bas ou de hauts niveaux de neuropeptides orexigéniques. Populations de neurones en culture changent de bas à haut niveau d'expression de ces peptides.
	Plagemann et al. 1998	Rat Wistar	GDM	G	PND1 et PND21	Hypothalamus	Altération de l'expression de catécholamines : augmentation norepinephrine et/ou dopamine dans PVN, LHA, VMN
	Harder et al., 2001	Rat Wistar	GDM	G	PND90	Hypothalamus	Disruption de l'expression de neuropeptides orexigéniques et anorexigéniques. Sauvetage du phénotype par transplantation d'îlots pancréatiques --> hyperglycémie ou hypoinsulinémie peuvent être les contributeurs principaux de la programmation des malformations de l'hypothalamus de la descendance. Diminution du nombre de neurones dans le VMN
	Franke et al., 2005	Rat Wistar	GDM (streptozotocine) +/- transplantation d'îlots pancréatiques	G	S	Hypothalamus	Modification d'expression de neuropeptides orexigéniques et anorexigéniques (diminution a-MSH, augmentation de AgRP et NPY)
	Franco et al., 2012	Rat Wistar	Obésité maternelle et/ou GDM	G	S	Hypothalamus - ARC	Diminution de phosphorylation de STAT3 associé à diminution d'expression de SOCS3
	Glavas et al., 2010	Souris Swiss Webster	Obésité maternelle et surnutrition post-natale	G+PN	PND16 et Ad	Hypothalamus	Hyperphagie associée à la résistance à la leptine dans l'ARC
	Kirk et al., 2009	Rat Sprague-Dawley	Obésité maternelle (HF+HSD)	G+L	PND90	Hypothalamus	Hyperphagie associée à la résistance à la leptine, adipokine anorexique
	Kirk et al., 2009	Rat Sprague-Dawley	Obésité maternelle (HF+HSD)	G+L	PND90	Hypothalamus	Changement d'expression et de régulation des neuropeptides en aval de l'hypothalamus ie. NPY et AgRP --> Résistance centrale à la leptine
	Chen et al., 2009	Rat Sprague-Dawley	HFD maternel	P+G+L	PND20	Hypothalamus	Changement d'expression et de régulation des neuropeptides en aval de l'hypothalamus ie. NPY et AgRP --> Résistance centrale à la leptine
	Dias-Rocha et al., 2018	Rat Wistar	HFD maternel	P+G+L	N et PND180	Hypothalamus	Augmentation des récepteurs aux endocannabinoïdes, orexine A, POMC
Caruso et al., 2011	Rat Sprague-Dawley	HFD maternel et/ou post-sevrage	P+G+L+PS	PNW15	Hypothalamus	Association entre hyperphagie et augmentation de l'expression de gènes FTO (variants associés à un risque accru d'obésité)	
Préférence alimentaire, circuit de la récompense	Bayol et al., 2007	Rat Wistar	HFD / régime caféteria maternel	P+G+L	Ad	Prise alimentaire/préférence alimentaire	Augmentation de la préférence alimentaire pour les aliments gras et sucrés et développement d'obésité
	Ong and Muhlhauser 2011	Rat	HFD / régime caféteria maternel	P+G+L	PNW6 et PNM3	Structures du circuit de la récompense	Augmentation de la préférence alimentaire pour les aliments gras et sucrés et développement d'obésité. Programmation du système de récompense mésolimbique (augmentation de l'expression de Mu et diminution de DAT à 6 semaines; inversion des tendances à 3 mois --> altération de l'activation en réponse à divers stimuli, nourriture incluse.
	Wright et al., 2011	Rat Wistar	Obésité maternelle	P+G+L	PNW20	Hypothalamus	Augmentation de la fréquence et de la durée de consommation alimentaire. Augmentation hypothalamique des niveaux de sérotonine et dopamine
	Naef et al., 2008	Rat	HFD	PN	Ad	Structures du circuit de la récompense (VTA, NAc et PFC)	Programmation du système de récompense mésolimbique (particulièrement NAc) --> altération de l'activation en réponse à divers stimuli, nourriture incluse.
Senseur neuronal des nutriments et activation	Davidowa et al., 2003	Rats	Hyperalimentation	NN	Ad	Hypothalamus - PVN	Switch d'activation à inhibition par la melanocortine et NPY
	Davidowa et al., 2006	Rats	Hyperalimentation	NN	PND60 à 120	Hypothalamus - PVN	Inhibition (au lieu d'activation) de neurones parvo-cellulaires par signal anorexigénique (ie. Leptine et insuline). Participation des interneurons GABA car leur blocage normalise la réponse neuronale.
	Zippel et al., 2003	Rat Wistar	Hyper/Hypo-nutrition	NN	Ad	Hypothalamus - LHA	Altération du taux de décharge basal des neurones ainsi que de leur réponse électrique à l'administration de dopamine et CCK
	Le Foll et al., 2009	Rats	HFD maternel	P+G+L	PNW3 semaines	Hypothalamus - VMN	Altération de la détection des nutriments en absence de phénotype particulier de poids corporel
	Tschenk et al., 2015	Poulet	Hyperglycémie transitoire par injection de glucose dans un vaisseau de la membrane chorio-allantoïque de l'œuf	14 au 17 <sup>ème</sup> jour d'incubation (gestation tardive)	PND21	Hypothalamus	Diminution de la sensibilité neuronale au glucose et altération de l'expression de transporteurs du glucose (diminution GLUT1/3 ARNm)
Mécanisme de programmation : Leptine	Ishii and Bouret, 2012	Souris (mâles)	Observation	NA	E12 et E16	Hypothalamus	La majorité des neurones activés par la leptine sont générés à E12
	Mistry et al., 1999	Souris ob/ob	déficience leptine +/- injection de leptine	NN (PND7 à PND10)	PND11	Phénotype	Pas de phénotype métabolique --> rôle particulier de la leptine pendant la période post-natale précoce comparé à plus âgé
	Cottrell et al., 2009	Rat Wistar	Injection de leptine	PN	Post-natal	Hypothalamus	LepR exprimé au niveau du 3ème ventricule à P4 et activé par leptine. Plus le cas à P14
	Caron et al., 2010	Souris C57BL/6J	NA	NA	PND10 et PND60	Cortex, hippocampe, noyau laterodorsal du thalamus	Expression transitoire de LepR ailleurs que dans des zones associées à la dépense énergétique
	Bouret et al., 2004	Souris ob/ob	déficience leptine	G+PN+Ad	PN+Ad	Hypothalamus	Réduction permanente des projections neuronales de l'ARC --> rôle neurotrophique de la leptine. Sauvetage par injection de leptine à P12 mais pas à l'âge adulte --> fenêtre de développement limitée pour l'action de la leptine
	Bouyer and Simerly, 2013	Souris ob/ob	déficience leptine	NA	PN	Hypothalamus	Diminution des projections AgRP et a-MSH vers les cellules neuroendocrines du PVN et diminution des projections AgRP vers les cellules pré-autonomes du PVN (projections a-MSH indépendante de la leptine et sauvetage du phénotype AgRP par injection de leptine entre P4 et P14)
	Bouret et al., 2004	Souris C57BL/6	NA	NA	PND4 à PND21	Hypothalamus	Activation de noyaux hypothalamiques individuels permis que après innervation par les fibres de l'ARC --> le rôle neurotrophique de la leptine est responsable de l'habitabilité de la leptine à activer d'autres zones hypothalamiques
	Bouret et al., 2012	Souris C57BL/6 wt x LepR-/-	Déficience en LepR	NA	Ad	Hypothalamus	La signalisation via LepR est nécessaire au rôle de la leptine dans la croissance de neurites depuis l'ARC. La formation du circuit de la balance énergétique est permis par différentes voies de signalisations en aval de LepR
	Ahima and Hileman, 2000	Souris C57BL/6J	Injection de leptine	PND10 à PND17 ou à PNW12 (7j)	PN+PS+Ad	Hypothalamus (expression de gènes), poids corporel, leptinémie sanguine	Poussée de leptine indépendante de la masse au cours de la seconde semaine post natale. La poussée n'est pas associée à des changements de poids corporel ni de glycémie ou d'insulinémie. Diminution d'expression d'AgRP et NPY, augmentation d'expression de CART
	Granado et al., 2011	Rat Wistar	Administration de leptine sous-cutanée	PN	PN+Ad	Prise alimentaire, paramètres biochimiques, composition corporelle	Administration : diminution à long terme de la prise alimentaire et des niveaux de ghreline, sans changement de poids corporel
	Mela et al., 2012	Rat Wistar	Antagoniste de la leptine	PND9	PND9	Hypothalamus	Pas d'effet sur la prise alimentaire, diminution du poids corporel à l'âge adulte et augmentation de l'expression de BDNF, CART et LepR chez les femelles, sans effet chez les mâles
	Kirk et al., 2009	Rat Sprague-Dawley	Obésité maternelle et/ou injection de leptine	G+PND30+PND90	PN précoce, PND30 et PND90	Hypothalamus et comportement	Poussée de leptine amplifiée et prolongée, accompagnée d'une diminution d'innervation neuronale AgRP- du PVN et associé à une hyperphagie à l'âge adulte
	Long et al., 2011	Mouton	Obésité maternelle	G	PN+Ad	Paramètres sanguins	Poussée de leptine post-natale présente plus tôt que chez le rat. MatOB --> abolition de la poussée de leptine (possible action via augmentation du cortisol post-natal), associée à hyperphagie et poids corporel augmenté à l'âge adulte
	Schubring et al., 1998	Humain	Grossesse	G	G+N+PNW6	Leptinémie maternelle	Augmentation au cours du premier et deuxième trimestre, pic au troisième trimestre et retour au niveau préconceptionnel immédiatement à la parturition
	Atarassova and Popova, 2000	Humain	Grossesse	G	Fœtal	Tissus sous cutané; Mesure d'expression de gènes en immunohistochimie	Placenta = source majeure de leptine mais leptine aussi produite par le tissu adipeux fœtal.
	Clapp and Kiess, 1998	Humain	Grossesse	PN précoce	PN précoce	Sang de cordon/Leptinémie	Leptinémie fœtale directement corrélée à adiposité fœtale --> faible contribution de la leptine maternelle ou placentaire
	Limman et al., 2000	Humain	Grossesse	PN précoce	PN précoce	Sang de cordon/Leptinémie	La majorité de la leptine produite par le placenta est transportée dans la circulation maternelle
Leporeq et al., 2001	Humain - Placenta	Grossesse	PN précoce	PN précoce	Leptinémie placentaire	La source principale de leptine fœtale sont les organes fœtaux	
Mécanisme de programmation : Insuline	Bhat, 1983	Souris - Cellules cérébrales embryonnaires dissociées	Insuline	NA	NA	Croissance neuronale	L'insuline a un effet neurotrophique et est essentielle à la régénération in vitro de neurones de CNS
	Recio-Pinto and Ishii, 1984	Cellules de neuroblastome humain	Insuline	NA	NA	Croissance neuronale	L'insuline a un effet neurotrophique et peu promouvoir la croissance de neurite dans des cultures de cellules neuronales en culture
	Schechter and Abboud, 2001	Rat Spargue-Dawley - Cellules cérébrales embryonnaires (E16) dissociées	Insuline/IGF-1 OU anticorps anti-insuline	NA	NA	Croissance neuronale	Moins de cellules dans le groupe avec anticorps --> l'insuline à un rôle dans la croissance cellulaire cérébrale
	Song et al., 2003	Drosophile	NA	NA	NA	Développement du système visuel	Insuline essentielle au guidage axonal
	Pierson et al., 2003	Rats BB (prédiabétiques, diabétiques et non diabétiques)	Lésion du nerf sciatique	PNW6	Avant et après lésion	Mesure de vélocité de conduction du message nerveux moteur	Responsable de l'altération de la réponse neurotrophique aux blessures observé chez T1DM, plutôt que hyperglycémie
	Mill et al., 1985	Cellules de neuroblastome humain	NA	NA	NA	Formation des neurites, expression de gènes	Suggestion de rôle de la signalisation leptine dans la stabilisation de la machinerie des microtubules
	Wang et al., 2014	Cellules en culture PC12 (pheochromocytome de rat) échantillons de cerveaux humains avec encéphalite à HIV	Dommages cellulaires	NA	NA	Immunohistochimie	Rôle de l'insuline dans le réarrangement des structures neuronales
	Jones et al., 1995	Rat	Injection d'insuline à la mère gestante OU Sous-nutrition suivi de CD + HFD post natal	G (E14 à E20)	~ PND95	Hypothalamus et poids corporel	L'insuline entraîne un retard dans l'apparition de l'obésité des descendants et augmente le niveau de noradrénaline hypothalamique et l'innervation en neurones noradrénériques du PVN
	Jones et al., 1996	Rat Spargue-Dawley	Injection maternelle d'insuline	G (E14 à E20)	PND121	Hypothalamus	Augmentation de l'innervation norepinephrique du PVN
	Plagemann et al., 1992	Rat	Hyperinsulinémie localisée	NN (PND2 et PND8)	Ad	Hypothalamus	Augmentation du poids corporel, hyperinsulinémie, tolérance au glucose altérée. Altérations morphologiques des noyaux hypothalamiques, incluant ARC et PVN
	Plagemann et al., 1999	Rat Wistar	Hyperinsulinémie localisée	PND8	PND15	Hypothalamus	Altérations morphologiques de DMN, PER et NVM
	Harder et al., 1998	Rat Wistar	Injection d'insuline sous-cutanée journalière	NN (PND8 à 11)	Ad	Paramètres physiologiques/composition corporelle	Augmentation du poids corporel, hyperinsulinémie, tolérance au glucose altérée et réduction de volume du NVM
Vogt et al., 2014	Souris	Souris transgéniques sans InsR sur neurones POMC et Hypernutrition maternelle pendant allaitement	L	PNW8 et 20	Hypothalamus	Signalisation de l'insuline sur neurones POMC est responsable de la perturbation de la projection aux neurones pré-autonomes du PVN	
Mécanisme de programmation : régulation épigénétique du génome	Guenard et al., 2013	Humain	Obésité maternelle et gastric bypass	G	PNM32 à 25 ans	Etude de fratrie et méthylation ADN, dans le sang	Différences significatives de méthylation de gènes de régulation du glucose
	Suter et al., 2012	Macaques japonais	HFD maternel	G+L	fœtal	Activité HDAC de SIRT1 hépatique(?)	Diminution de l'activité HDAC lié au régime alimentaire, indépendant de l'obésité maternelle. Augmentation H3K14Ac
	Olsen et al., 2012	Zebrafish	Diabète induit (streptozotocine) et cessation du traitement	Ad	Ad	Nageoire caudale	Activité DNMT régulée par glycémie --> modifications du niveau global de méthylation de l'ADN. Doute sur corrélation positive ou négative entre glycémie et état de méthylation
	Chiang et al., 2009	Humain - lignée de cellules de carcinome hépatocellulaire	Insuline et glucose	NA	NA	Etat de méthylation, expression de gènes	Activité DNMT régulée par glycémie --> modifications du niveau global de méthylation de l'ADN. Doute sur corrélation positive ou négative entre glycémie et état de méthylation
	Li et al., 2014	Souris C57BL/6J	NA	NA	PND0 et PND21	Hypothalamus	Les modifications épigénétiques majeures distinguant les astrocytes et neurones ont lieu après la naissance et de manière noyau-spécifique --> un changement de statut nutritionnel affectant la machinerie épigénétique au cours de la période post-natale précoce pourrait avoir un effet sur la décision du destin cellulaire
	Kuroda et al., 2009	Humain et rongeur	NA	NA	NA	Cellules β-pancréatiques, expression de gènes, méthylation ADN	Expression tissu spécifique du gène de l'insuline dans les cellules B pancréatiques est associée à l'hyperméthylation du promoteur sur des CpG spécifiques
	Marchi et al., 2011	Humain	Obésité et bypass gastrique	NA	Post-op	Tissus adipeux et foie	La méthylation du promoteur de la leptine est responsable de l'expression tissu spécifique de ce locus
	Bouchard et al., 2010	Humain	Altération maternelle de la tolérance au glucose	G	Périn	Placenta et sang de cordon	L'état de méthylation du promoteur de la leptine du placenta (côté fœtal) est positivement corrélé au niveau de glucose circulant chez la mère --> hyperglycémie maternelle entraîne diminution d'expression de la leptine dans le placenta et peut donc affecter le développement de la descendance
	Khalifa et al., 2013	Souris C57BL/6J	HFD maternel	G tardive	post-natal	Tissus adipeux	Hyperméthylation du promoteur de LepR associé à une diminution d'expression
	Plagemann et al., 2009	Rat Wistar	Sur-nutrition	NN	PND21	Hypothalamus	Hyperméthylation de CpG du promoteur de POMC, au site de fixation Sp1 --> défaut de régulation de l'ARNm POMC en réponse à la leptine ou l'insuline
	Marco et al., 2014	Rat	Obésité maternelle	G	L	Hypothalamus, ARC	Hyperméthylation à 500pb en amont de l'ATG du gène POMC --> diminution d'expression de pomc et augmentation du poids corporel
	Vucetic et al., 2010	Souris C57BL/6J	HFD maternel	G+L	Ad	Hypothalamus	Hypométhylation du promoteur du transporteur de la dopamine associée à une diminution de son expression
	Marco et al., 2016	Rat Wistar	HFD maternel	P+G+L	PND10	Hypothalamus	Hyperméthylation du promoteur POMC
Zheng et al., 2015	Souris	HFS maternel	G+L	PNW32	Hypothalamus	Hypométhylation du promoteur POMC	
Almeida et al., 2019	Rat Wistar	HFD maternel	P+G	fœtal	Hypothalamus	Augmentation acétylation des histones du promoteur du récepteur 1 aux endocannabinoïdes associé à une augmentation de son expression (mâles)	

Tableau 4. Effets de la physiologie maternelle et de l'environnement post-natal sur l'hypothalamus

La couleur des cases de facteur de stress indique : un régime maternel HFD/HFS ou une obésité maternelle (jaune), un diabète gestationnel (vert), un effet de la nutrition néo-natale ou post-natale (bleu), une perte de poids maternelle (mauve). Phase d'application du stress : P-préconception, G-gestationnelle, L-lactation, N-naissance, Périn-périnatal, NN-néonatal, PN-postnatal, PND-jour postnatal, PNW-semaine postnatale, PNM-mois postnatal, S-sevrage, A-adulte, NA-non applicable.

## 3.2) Effets hypothalamiques

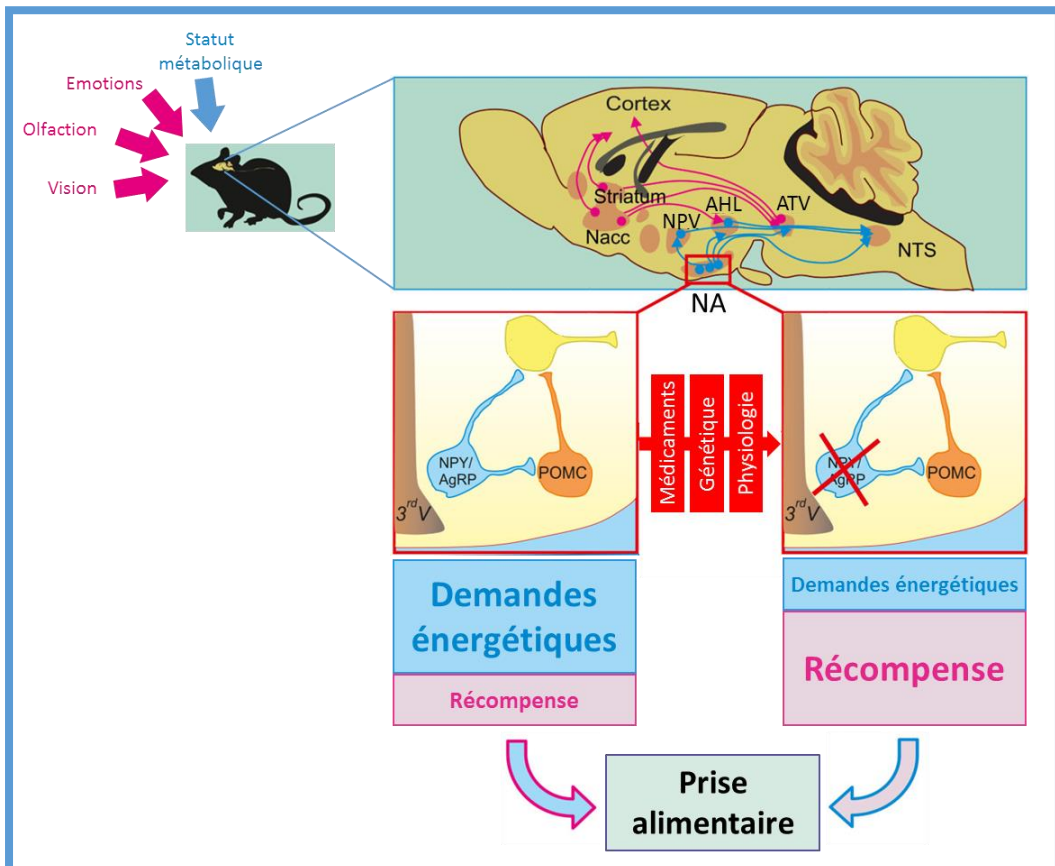
### 3.2.1) Effets de la physiologie maternelle sur l'hypothalamus

La revue de la littérature faite par **Dearden et Ozanne** est très complète, et outre l'obésité maternelle induite, plusieurs aspects de la physiologie maternelle y sont explorés, sur différents modèles (Dearden et Ozanne 2015).

Le **diabète maternel** induit par l'alimentation ou par traitement chimique (streptozotocine) a des effets néfastes au cours de la gestation ainsi qu'au cours de la lactation. Une mauvaise programmation et une désorganisation des systèmes de neurones oréxigéniques et anoréxigéniques sont observées avec des défauts de connections entre différents noyaux hypothalamiques (en particulier du NA vers les autres noyaux) (**Tableau 4**). De plus, l'expression de différents gènes est altérée dans l'hypothalamus, en particulier les gènes de neuropeptides impliqués dans la régulation alimentaire (AgRP, NPY,  $\alpha$ -MSH, norepinephrine, dopamine) (**Tableau 4**). Chez le poulet, une hyperglycémie transitoire au cours de la gestation peut à elle seule diminuer la sensibilité neuronale au glucose et modifier l'expression de transporteurs du glucose (**Tableau 4**) (Tzschentke et al. 2015). Ceci peut conduire à des défauts de réponse à l'hyperglycémie par exemple.

L'**hyperleptinémie** constatée chez les mères obèses peut entraîner une résistance à la leptine chez la descendance. Une injection de leptine à ces descendants après le sevrage échoue à faire réduire la consommation alimentaire, ce qui révèle une altération dans le contrôle du comportement alimentaire, induit par l'obésité maternelle (Kirk et al. 2009). Cette hyperphagie est associée à une diminution du nombre de connections AgRP du NA vers le PVN.

Le rôle des neurones AgRP a été étudié en détail par Denis et al., en utilisant différents modèles d'ablation de ces neurones. Ainsi, lorsque l'activité des neurones AgRP est altérée, le comportement alimentaire est en partie assuré par des réponses liées aux circuits de réponse émotionnelle au stress. Les comportements alimentaires sont alors modulés par l'appétence alimentaire et la signalisation de la dopamine (Denis et al. 2015). Suite à ces modifications neuroanatomiques, les comportements alimentaires pourraient être graduellement contrôlés par l'hédonisme alimentaire et le circuit de la récompense, avec la participation des signaux orosensoriels qui informent du potentiel hédonique de la nourriture (**Figure 40**) (Denis et al. 2015).



**Figure 40. Contrôle de la prise alimentaire par les neurones AgRP**

En condition normale, l'action des neurones AgRP régule la prise alimentaire via leur action oréxigénique, lié statut métabolique de l'organisme. En l'absence de ces neurones, la prise alimentaire est contrôlée par les signaux émotionnels, olfactifs et visuels, activant le circuit de la récompense (ATV, Nacc, Striatum), ce qui favorise les comportements alimentaires hédoniques.

NA – noyau arqué ; Nacc – noyau accumbens ; NPV – noyau paraventriculaire ; AHL – aire hypothalamique latérale ; ATV – aire tegmentaire ventrale ; NTS – noyau du tractus solitaire

Adapté de Denis et al., 2015



La physiologie maternelle a donc un impact important dans la mise en place des circuits hypothalamiques de la régulation alimentaire, au niveau de la sensibilité aux nutriments mais aussi dans les comportements alimentaires.

### **3.2.2) Impact de la nutrition hyperlipidique maternelle sur l'hypothalamus**

La nutrition maternelle hyperlipidique impacte non seulement la santé de la mère, mais peut aussi agir sur les fonctions cérébrales de la descendance, en particulier les systèmes neuroendocriniens (E. L. Sullivan et al. 2015; Contu et Hawkes 2017). Un lien entre excès de lipides, inflammation, modification des circuits hypothalamiques et altérations métaboliques ayant été mis en évidence, plusieurs modèles animaux ont été mis en place pour étudier l'impact d'un régime hyperlipidique maternel sur le développement et les fonctions hypothalamiques, du fait de leur importance dans le contrôle de la prise alimentaire. Les modèles de rongeurs sont néanmoins les plus répandus.

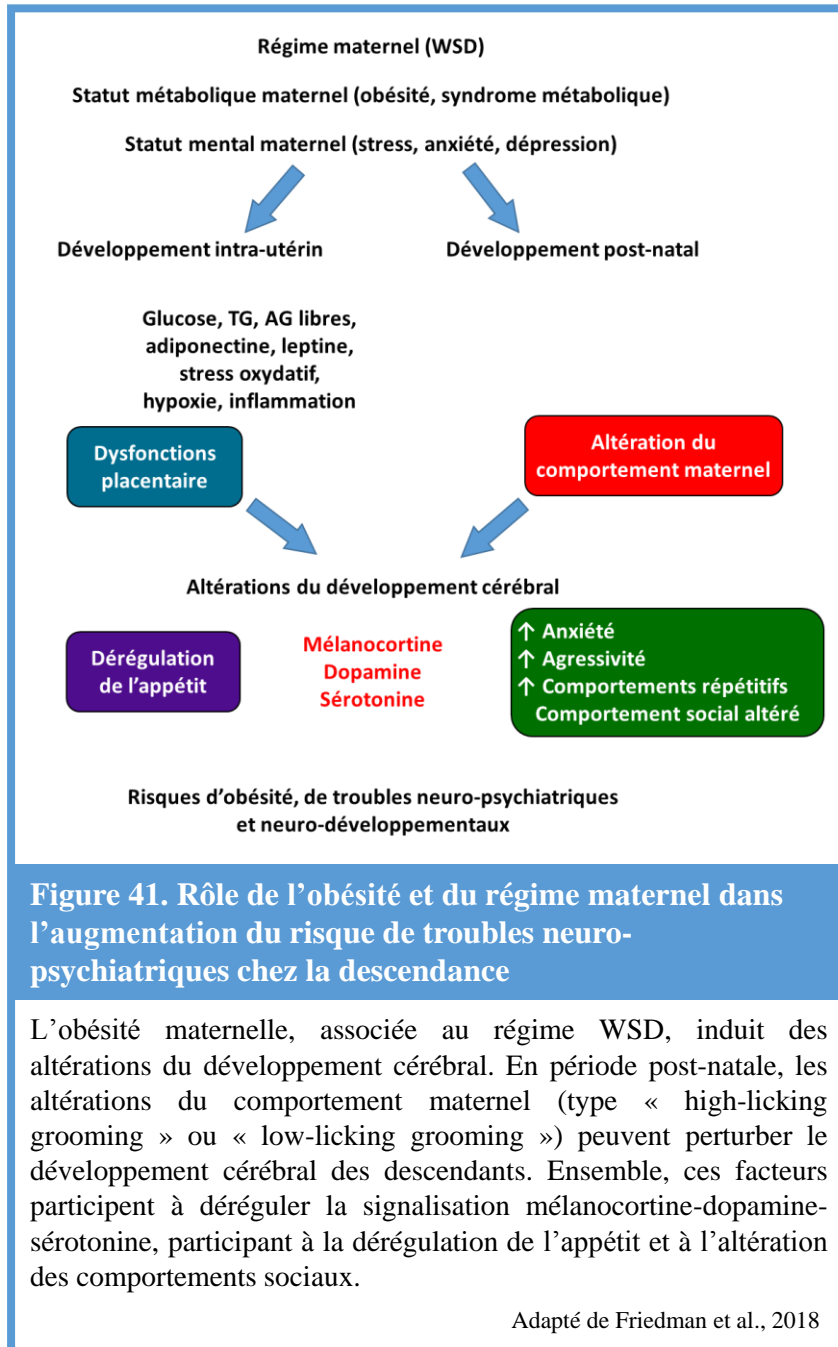
Différentes fenêtres d'application du régime ont été étudiées du stade préconceptionnel au stade post-sevrage. Elles mettent en évidence des modifications de la dynamique et de l'architecture cellulaire, des modifications neurochimiques et géniques dès le stade fœtal avec des répercussions comportementales à différents âges et sont résumées dans le **Tableau 4**.

Au cours de la gestation, le HFD maternel stimule la prolifération cellulaire, modifie la neurogenèse et augmente la migration neuronale vers certains noyaux hypothalamiques tendant à favoriser un phénotype orexigénique (Chang et al. 2008). Ceci est associé au stade néo-natal à une modification d'expression de gènes impliqués dans la maturation des cellules souches neuronales (Chang et al. 2008; Yu et al. 2014). Le nombre de neurones est impacté par le HFD maternel, et on assiste aussi à une diminution des connections intra-hypothalamiques en cas d'obésité maternelle induite, en particulier les projections depuis le NA. Ces effets sont visibles chez la souris dès la gestation tardive où des mécanismes de signalisation sont perturbés (Sanders et al. 2014), mais aussi à l'âge adulte, où ces réductions de projections sont retrouvées (Vogt et al. 2014). Certains effets persistent dans la période juvénile comme montré chez les macaques (Elinor L. Sullivan et al. 2017). Chez la souris, une augmentation de la prolifération des astrocytes, cellules régulatrices des apports énergétiques au neurones, est observée dans le NA (D. W. Kim et al. 2016). Enfin, des atteintes mitochondriales ont été récemment mises en évidence, chez le rat, par ultrastructure et analyse de l'expression de gènes dans l'hypothalamus suite à un régime HFD (Cardenas-Perez et al. 2018).

Au niveau moléculaire, l'impact hypothalamique du régime HFD maternel a été étudié chez la descendance en cours de gestation et jusqu'à l'âge adulte. Plusieurs expérimentations ont démontré une modification de l'expression de gènes liés au contrôle de la prise alimentaire, en particulier ceux de neuropeptides orexigéniques (NPY, AgRP) et anorexigéniques (POMC,  $\alpha$ -MSH, CART). Leur expression est modifiée à l'état basal, mais aussi en réponse à un challenge lipidique ou glucidique (**Tableau 4**) (H. Chen, Simar, et Morris 2014; Page et al. 2009)). Il est aussi rapporté une modification d'expression de gènes du métabolisme glucidique (LepR, mTOR, GLUT1) ou de la signalisation associée à cette régulation (diminution de la phosphorylation de STAT3) (**Tableau 4**) (Franco et al. 2012; Férézou-Viala et al. 2007). Enfin, une dérégulation de la signalisation via les endocannabinoïdes a été récemment associée à la programmation métabolique de la descendance (Dias-Rocha et al. 2018).

De manière intéressante, l'obésité maternelle (hyperlipidique ou "junk food") entraîne une modification du comportement alimentaire chez la descendance. Il s'agit principalement d'une augmentation de la préférence alimentaire pour les aliments gras et/ou sucrés, associés à une augmentation de la fréquence et de la durée de consommation alimentaire (**Tableau 4**). Ces modifications du comportement sont associées à une dérégulation du système de récompense, qui se traduit par une augmentation des niveaux de sérotonine et de dopamine dans l'hypothalamus (**Tableau 4**) (Wright et al. 2011; Denis et al. 2015). Elles sont aussi démontrées au niveau mésolimbique, le noyau accumbens présentant une altération de l'activation de ces systèmes en réponse à divers stimuli, dont la nourriture (**Tableau 4**).

Enfin, les systèmes de détection et d'activation neuronale par les nutriments sont impactés par le régime hyperlipidique maternel, mais aussi par une hyperalimentation néonatale. Cela peut passer par un défaut de détection des nutriments (post-sevrage) ou un switch d'activation à inhibition en réponse à un stimulus et un défaut de décharge neuronal (âge adulte) (**Tableau 4**). Les travaux de **Peleg-Raibstein et al.** ont mis en évidence une hyperphagie en cas de présentation de nourriture à fort potentiel appétant, tel qu'un régime HFD ou une eau sucrée, ainsi qu'une augmentation des comportements d'abus de substance telle que l'alcool ou la cocaïne (D Peleg-Raibstein et al. 2016). Les niveaux de dopamine sont réduits chez les descendants exposés au régime HFD maternel, tandis que le nombre de récepteurs à la dopamine est augmenté. Cela peut indiquer une désensibilisation dans le rétrocontrôle du circuit de la récompense qui favorise les comportements d'abus ou hédoniques.



**Figure 41. Rôle de l'obésité et du régime maternel dans l'augmentation du risque de troubles neuro-psychiatriques chez la descendance**

L'obésité maternelle, associée au régime WSD, induit des altérations du développement cérébral. En période post-natale, les altérations du comportement maternel (type « high-licking grooming » ou « low-licking grooming ») peuvent perturber le développement cérébral des descendants. Ensemble, ces facteurs participent à déréguler la signalisation mélanocortine-dopamine-sérotonine, participant à la dérégulation de l'appétit et à l'altération des comportements sociaux.

Adapté de Friedman et al., 2018



Chez le primate non humain, un régime HFD maternel entraîne une diminution d'expression et de production d'AgRP au 3<sup>ème</sup> trimestre et augmente l'expression des récepteurs à POMC et MC4 dans le NA, ce qui peut expliquer les changements de régulation de l'appétit observés pendant la période post-natale. De manière intéressante, l'exposition gestationnelle et post-natale à un régime HFD entraîne de plus une diminution des connexions AgRP du NPV (Grayson et al. 2010) persistant dans la période juvénile (Elinor L. Sullivan et al. 2017). L'ensemble des informations recueillies dans des modèles de primates non humain démontre que l'hyperalimentation maternelle au cours de la gestation et de la période périnatale est un acteur majeur de troubles neurologiques et métaboliques pouvant conduire au syndrome métabolique à l'âge adulte (**Figure 41**) (Friedman 2018).

### **3.3) Effet de l'environnement maternel sur le développement de la sphère olfactive**

#### **3.3.1) Cas particulier des composants odorants**

Nous avons vu précédemment que la mémorisation olfactive n'est pas restreinte à l'enfance précoce, mais commence lors du développement intra utérin (Nicolaidis 2008) (**Figure 39**). Or, l'environnement sensoriel dans lequel le fœtus se développe change en fonction des choix alimentaires de la mère (Nehring et al. 2015). L'introduction de molécules odorantes dans le liquide amniotique, par l'alimentation maternelle, induit une préférence pour la même molécule odorante chez la descendance, ce qui a été montré pour la carotte (Nicolaidis 2008; Beauchamp et Mennella 2009), l'anis (Schaal, Marlier, et Soussignan 1995) ou l'ail (Hepper et al. 2013) dans diverses espèces. Après la naissance, l'exposition au lait maternel permet aussi de développer une mémoire et par conséquent établir les préférences alimentaires. Le lait maternel, au même titre que le liquide amniotique, contient des composés odorants reflétant l'alimentation maternelle qui participent à la continuité sensorielle transnatale chez l'homme comme l'animal (Marlier, Schaal, et Soussignan 1998; Logan et al. 2012). La consommation maternelle de poisson, de légumes verts ou de fromage, au cours de la grossesse et/ou pendant la lactation entraîne une préférence pour ces saveurs chez les descendants (Wagner et al. 2019). L'exposition précoce à certaines substances pourrait donc participer à la mise en place de comportement de préférence, voire d'abus de ces substances ainsi qu'influencer les choix alimentaires des descendants par le potentiel hédonique des

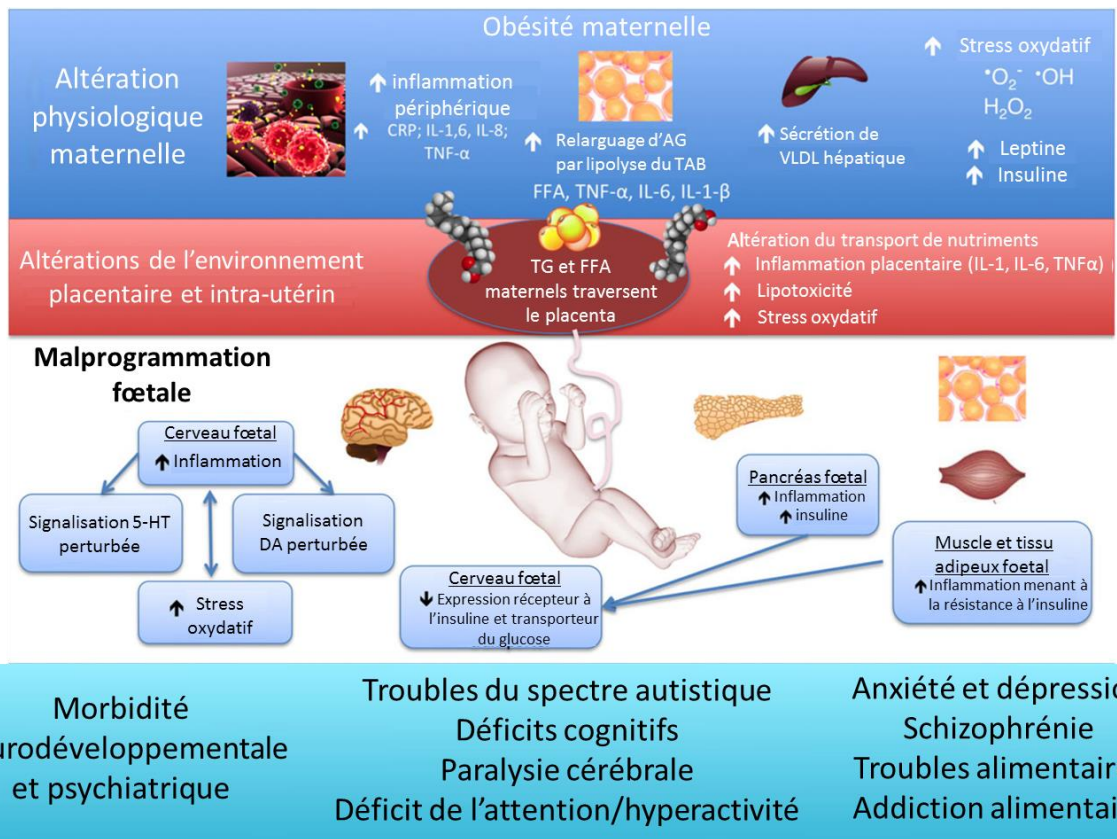
aliments (Youngentob et al. 2007; Nicolaïdis 2008). Ceci peut expliquer l'acceptation et l'appréciation de la nourriture par les enfants au moment de la transition à une alimentation solide, la large variété de préférences alimentaires entre les individus et la transmission de ces préférences d'une génération à une autre (Nicolaïdis 2008). Les mécanismes responsables de la plasticité périphérique du système olfactif, en lien avec le contexte odorant périnatal, commencent à être décryptés et mettent en œuvre des modifications morphofonctionnelles des circuits neuronaux, dans la muqueuse et le bulbe olfactif (Todrank, Heth, et Restrepo 2011; Cadiou et al. 2014; Gaztañaga, Aranda-Fernández, et Chotro 2015; Valle-Leija 2015; Dewaele et al. 2018), mais aussi sur les réseaux cognitifs d'intégration (Ventura et Worobey 2013; Nicklaus 2016).

### **3.3.2) Effet du contexte métabolique maternel sur le système olfactif**

Au-delà de l'aspect mémoriel des odeurs, peu d'études ont été réalisées dans le but d'identifier les mécanismes par lesquels une modification du statut énergétique lié à l'alimentation maternelle peut impacter les facultés olfactives de la descendance dès le jeune âge. Pourtant, au vu de l'importance de la signalisation métabolique dans ces tissus et de leur rôle dans les choix alimentaire mentionnée au-dessus, l'appréciation des effets sur ces structures périphériques est un point important à considérer.

Chez le rat, une restriction nutritionnelle gestationnelle affectant la trajectoire pondérale des descendants entraîne une diminution de la production d'endocannabinoïdes et de lipides liés aux cannabinoïdes dans le bulbe olfactif chez la descendance femelle (Ramírez-López et al. 2017). Une lactation maternelle insuffisante est associée à une diminution du poids corporel et du poids cérébral des descendants, ainsi qu'une diminution du nombre de dendrites et de la taille du bulbe olfactif (Frias et al. 2009). Un retard de croissance intra-utérin provoqué par une déficience gestationnelle en donneur de méthyl modifie les capacités de discrimination olfactive des descendants de manière sexe-dépendante (El Hajj Chehadeh et al. 2014).

Chez la souris, un régime HFS maternel préconceptionnel et/ou gestationnel entraîne une modification de la sensibilité olfactive dès le sevrage : les descendants passent plus de temps à chercher les aliments enfouis dans la litière et réagissent moins à la présentation de molécules odorantes à faible concentration, sans altération de la sensibilité de la muqueuse olfactive (Merle et al. 2019). Ces résultats illustrent une diminution des facultés olfactives au niveau central ainsi qu'une altération du comportement olfactif. Il est à noter que la



**Figure 42. Mécanismes par lesquels l'obésité maternelle peut induire une morbidité neurodéveloppementale et psychiatrique chez la descendance**

Une altération de la physiologie maternelle entraîne une augmentation de l'inflammation, de la lipotoxicité et du stress oxydatif de l'unité fœto-placentaire. Ces modifications de l'environnement intra-utérin contribuent à la malprogrammation de plusieurs tissus fœtaux parmi lesquels font partie le cerveau et le tissu adipeux. L'inflammation et la résistance à l'insuline périphérique contribuent à la résistance centrale à l'insuline ainsi qu'aux aberrations du métabolisme et du transport du glucose.

CRP – protéine C-réactive ; DA – dopamine ; FFA – AG libres ; IL – interleukine ; TG – triglycéride ; TNF – tumor necrosis factor ; VLDL – very low-density lipoprotein ; 5-HT - sérotonine

Adapté de Edlow et al., 2017

composition du lait maternel est modifiée, il se trouve enrichi en acide oléique, un AG mono-insaturé et déplété en AG saturés et poly-insaturés, en absence d'obésité maternelle. Les descendants naissent avec un poids normal, mais développent un surpoids au cours de la lactation et présentent au sevrage une augmentation de la masse grasse viscérale et une hyperleptinémie. D'autres travaux montrent qu'un régime HFD maternel atteint les circuits olfactifs impliqués dans la mémorisation d'une aversion conditionnelle odorante (Janthakhin et al. 2017).

Le développement *in utero* ainsi que la période de lactation sont donc importantes pour la mise en place du circuit neuronal sous-jacent au traitement des odeurs. De cette organisation dépendent les capacités olfactives des individus. De plus ce sont aussi des périodes cruciales dans la mise en place des préférences alimentaires, ce qui peut influencer le comportement alimentaire après la naissance et potentiellement jusqu'à l'âge adulte. L'alimentation maternelle joue un rôle prépondérant dans ces mécanismes et peut de plus impacter les capacités olfactives des descendants. Cependant les mécanismes aboutissant à ces effets ne sont pas encore complètement caractérisés.

#### **4) Mécanismes de programmation par la nutrition maternelle hyperlipidique dans le système nerveux central**

Les mécanismes potentiellement impliqués dans l'augmentation de la morbidité neurodéveloppementale des enfants de femmes obèses sont souvent intriqués (**Figure 42**) (Edlow 2017). Ces mécanismes incluent :

- Le stress oxydatif et l'inflammation ;
- La dérégulation de la signalisation à l'insuline, au glucose et à la leptine, dans le cerveau en développement ;
- Une dérégulation de la signalisation dopaminergique et sérotoninergique associée à une altération du circuit de la récompense ;

Les AG circulants sont présents en plus grande quantité chez les mères obèses en raison de l'apport alimentaire et d'une lipolyse accrue. Les AG circulants ont la capacité des à traverser le placenta ainsi qu'à accroître le stress oxydatif et l'inflammation, tous les deux pouvant affecter négativement les facultés cognitive des descendants (Edlow 2017). Plusieurs études sur des modèles animaux ont corroborées ce lien. Le régime HFD maternel entraîne chez la descendance une modification d'expression de gènes du métabolisme des ROS, un

accroissement de l'inflammation cérébrale et systémique, des déficits cognitifs ainsi qu'un comportement anxieux (E. L. Sullivan et al. 2015; Edlow 2017).

Chez le rat, le régime HFD maternel entraîne une diminution de l'expression du transporteur du glucose 1 en période post-natale ainsi qu'une diminution d'expression du récepteur à l'insuline et du récepteur à la leptine de la période post-natale à l'âge adulte (Edlow 2017). De plus, la leptine est un facteur neurotrophique important, la perturbation de sa signalisation est associée à une diminution de la différenciation et de la croissance de cellules souches neuronales (Desai, Li, et Ross 2011).

Des modèles animaux ont montré que le régime HFD maternel réduit la synthèse de sérotonine en association avec des déficits neuro-comportementaux tels que l'anxiété ou l'hyperactivité (E. L. Sullivan et al. 2015; Edlow 2017). Concernant la dopamine, une altération de sa signalisation, chez l'humain, est associée au développement de schizophrénie, de troubles alimentaires, de troubles du spectre autistique ou de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (E. L. Sullivan et al. 2015; Edlow 2017). Chez la souris, une exposition *in utero* à un régime HFD, entraîne à l'âge adulte, une diminution de la méthylation globale de plusieurs régions cérébrales associées à une dérégulation de l'expression du transporteur de la recapture de la dopamine ainsi qu'à une préférence accrue pour les aliments à haute teneur en lipides et glucides (Vucetic et al. 2010).

#### **4.1) Mécanismes impliqués dans la programmation développementale hypothalamique des descendants par la nutrition maternelle hyperlipidique**

La revue de la littérature effectuée par **Dearden et Ozanne** en 2015, et complétée ici, apporte également un éclairage sur les mécanismes pouvant être impliqués dans la programmation développementale induite par la nutrition maternelle hyperlipidique, en particulier pour pointer le rôle crucial des hormones comme la leptine et l'insuline dans la mise en place des circuits de la régulation alimentaire (**Tableau 4**).

L'implication de la signalisation par la leptine dans la mise en place des différentes connexions entre l'hypothalamus et les autres structures cérébrale, mais aussi en son sein, est particulièrement importante (Dearden et Ozanne 2015). Chez les rongeurs, un défaut de production de leptine par la mère ou le fœtus est associé à un défaut de formation des projections du NA, principalement les projections AgRP et  $\alpha$ -MSH, alors qu'une injection de leptine au cours de la fin de gestation restaure un phénotype AgRP normal (**Tableau 4**).

(Dearden et Ozanne 2015). Chez l'humain, il a été démontré que la majorité de la leptine fœtale est produite par le fœtus lui-même, la leptine ayant du mal à passer le placenta et la leptine y étant produite étant transportée dans la circulation maternelle (Lepercq et al. 2001). L'excès de nutriments apportés par l'alimentation maternelle serait donc responsable de l'augmentation de la masse grasse du fœtus et par conséquent de l'augmentation de la leptinémie fœtale (**Tableau 4**) (Dearden et Ozanne 2015). Une hyperleptinémie fœtale pourrait avoir des effets à long terme sur la descendance, mais elle n'a pas été encore bien caractérisée étant donné que la majorité des modèles expérimentaux sont réalisés en contexte de déficience en leptine (**Tableau 4**).

L'insuline est impliquée dans la neurogenèse, dans la mise en place de connexions dans le CNS, du réarrangement des structures neuronales en cas de dommages (**Tableau 4**). Une hyperinsulinémie maternelle gestationnelle provoquée par injection chez le rat entraîne un retard dans l'apparition de l'obésité des descendants et augmente le niveau de noradrénaline hypothalamique et l'innervation du NPV à l'âge adulte (A. P. Jones et al. 1995; A. P. Jones, Olster, et States 1996). En **période post-natale**, l'hyperinsulinémie systémique et hypothalamique entraîne une augmentation du poids corporel, une hyperinsulinémie et une altération de la tolérance au glucose. De plus il est constaté une altération morphologique de plusieurs noyaux hypothalamiques, dont le NA, le NPV, le NDM et le NVM (**Tableau 4**) (Dearden et Ozanne 2015). La signalisation à l'insuline au niveau des neurones POMC du NA, au cours de la lactation, semble responsable de la perturbation de la projection de ces neurones vers le NPV. En effet, en cas de nutrition maternelle hyperlipidique au cours de la lactation, les descendants déficients en récepteurs à l'insuline au niveau des neurones POMC présentent une densité de connexion semblable aux descendants sous régime contrôle (Vogt et al. 2014).

Enfin, des mécanismes épigénétiques semblent aussi impliqués dans la programmation hypothalamique par un régime hyperlipidique maternel (**Tableau 4**). Les données à ce jour impliquent la méthylation de l'ADN et/ou les marques des histones. Chez le rongeur, la nutrition maternelle hyperlipidique au cours de la gestation ou en période de lactation s'accompagne d'une hyperméthylation du promoteur du gène POMC associée à une diminution de son expression et à des défauts dans la régulation de son expression en réponse à l'insuline ou à la leptine (Dearden et Ozanne 2015; Marco et al. 2016) Une hypométhylation du transporteur de la dopamine dans l'HO a été également démontrée suite à un régime HFD (Vucetic et al. 2010). Les informations concernant l'impact hypothalamique du régime HFD

maternel gestationnel sont cependant peu nombreuses et parfois contradictoires selon le régime ou l'âge (Zheng et al. 2015; Marco et al. 2016).

Le développement de l'hypothalamus et la mise en place des connexions entre ses noyaux et avec d'autres structures cérébrales est critique dans l'établissement d'un circuit de contrôle de l'homéostasie énergétique et des comportements alimentaires. Une perturbation dans la mise en place de cette architecture complexe peut avoir des effets à plus ou moins long terme, tant en terme physiologique que comportemental. L'exposition précoce à un régime maternel hyperlipidique pourrait altérer cette mise en place via l'action de l'insuline, de la leptine et potentiellement de mécanismes épigénétiques. L'ensemble de ces facteurs peuvent favoriser un comportement alimentaire délétère ainsi que l'altération des mécanismes de contrôle de l'homéostasie énergétique de la descendance, participant de ce fait au développement de l'obésité et du syndrome métabolique.

#### **4.2) Mécanismes impliqués dans la programmation développementale du bulbe olfactif par la nutrition maternelle hyperlipidique**

Les mécanismes intervenant dans le développement du bulbe olfactif sont encore mal caractérisés. Ils impliquent probablement l'action d'un nombre important de facteurs de transcription, ainsi que de modifications épigénétiques, sur lesquelles je vais me concentrer. Les mécanismes épigénétiques sont reconnus comme des régulateurs clés de l'expression des gènes requis pour la maintenance et la spécification des cellules du SNC, et par extension, du bulbe olfactif.

La **méthylation de l'ADN** est importante pendant les phases précoces de la neurogenèse et quelques études suggèrent un rôle de l'hydroxyméthylation des cytosines dans les étapes tardives du développement neuronal (Díaz-Guerra et al. 2013).

La **méthylation des histones**, par les protéines du complexe *polycomb*, dirige les cellules vers des processus d'auto renouvellement principalement. Par exemple, Bmi1 catalyse la méthylation de H3K27 et régule l'auto-renouvellement et la maintenance du potentiel développemental des cellules souches neurales. Les protéines de la famille *trithorax* catalysent et maintiennent la méthylation de H3K4, résultant en des domaines chromatiniens transcriptionnellement actifs et stables. Par exemple, Mll1 encode une HMT, requise pour la

différenciation des cellules souches neurales en neurones, spécifiquement. De plus, cette protéine est nécessaire à la prolifération et à la neurogenèse à l'âge adulte dans le bulbe olfactif (Díaz-Guerra et al. 2013).

Concernant l'**acétylation des histones**, les HATs et les HDACs sont toutes deux impliquées dans la régulation de la neurogenèse à l'âge adulte (Sun et al. 2012). De plus, l'action des HDACs est critique dans la régulation de l'expression de la tyrosine hydroxylase (enzyme nécessaire à la synthèse de catécholamines) par les neurones progéniteurs et les neurones dopaminergiques matures du bulbe olfactif (Díaz-Guerra et al. 2013).



# **OBJECTIFS DE LA THESE**

## Objectifs de la thèse

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'un projet de plus grande envergure financé par la Fondation Cœur et Artères dont l'objectif était d'évaluer la « Mémoire épigénétique des Trajectoires Pondérales Maternelles Préconceptionnelles au cours du développement et à long terme » (projet TPMP). Ses objectifs ont été décidés sur la base des résultats acquis lors de la première phase de ce projet ayant montré :

i) les effets programmeurs de la perte de poids sur le phénotype du foie fœtal en termes de modification de l'expression de gènes notamment (Panchenko et al. 2016).

ii) un phénotype différencié des descendants F1 de la naissance à l'âge adulte, sur le plan métabolique (poids, prise alimentaire, métabolisme glucidique et lipidique) et olfactif (tests de comportement à base olfactive, électro-olfactogramme) (Panchenko et al. 2019).

La première partie des travaux de cette thèse a consisté à compléter l'analyse phénotypique du modèle TPMP, par un dosage de la leptine chez les descendants adultes. Cette hormone est en effet en lien avec le phénotype d'obésité aggravé observé dans la descendance des mères obèses. Un grand nombre de paramètres phénotypique ayant été étudiés chez les descendants F1, une analyse factorielle multiple (AFM) a été mise en œuvre afin d'avoir une vision globale de l'ensemble des résultats. Les premières conclusions du projet ont ainsi fait apparaître un conditionnement maternel de l'obésité des mâles F1 soumis après le sevrage à un régime obésogène. Les résultats et conclusions de ces analyses sont présentées dans la première partie consacrée aux résultats et ont été inclus dans l'article publié en 2019 (Panchenko et al. 2019).

La seconde partie du projet de thèse visait à raffiner l'analyse phénotypique et aborder des aspects mécanistiques de ce conditionnement, pour ce faire, deux objectifs distincts ont été poursuivis :

- **Poursuivre la description phénotypique des descendants mâles**, chez lesquels l'obésité maternelle est associée à une aggravation de l'obésité induite par un régime HFD (conditionnement maternel). Par ailleurs, ce régime HFD entraîne une modification du comportement alimentaire chez ces descendants, indépendamment du groupe maternel. Nous avons donc choisi d'analyser le phénotype métabolique du **foie** et de l'**hypothalamus**, deux structures impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique et dans la régulation du comportement alimentaire. Enfin la perte de poids maternelle ayant entraîné une diminution

de la sensibilité olfactive, indépendamment du régime post-sevrage (programmation développementale), nous avons décidé d'analyser le phénotype métabolique du **bulbe olfactif**. Les analyses métabolomiques, réalisées chez les descendants mâles soumis ou non à un régime HFD, nous ont permis d'identifier les voies métaboliques qui sont impactées par le statut maternel préconceptionnel ou le régime post-sevrage sur les échantillons de foie, d'hypothalamus et de bulbe olfactif des descendants mâles F1. L'entreprise Profilomic a été choisie pour réaliser les analyses brutes de métabolomique, qui ont été financées dans le cadre d'un appel d'offre du département Alimentation Humaine de l'INRA. J'ai réalisé les analyses biostatistiques et bioinformatiques de l'ensemble de ces données. Les résultats et conclusions de ces analyses font l'objet d'un article, à soumettre, présenté dans la première partie des résultats.

- **Décrypter les acteurs impliqués dans le conditionnement à long terme chez la descendance** du développement de pathologies métaboliques par l'obésité maternelle et l'impact de la perte de poids maternelle préconceptionnelle sur ces acteurs. La mémoire à long terme de cette exposition précoce (préconception, gestation, lactation) pourrait être portée par une double composante microbiote-épigénome. **L'analyse de l'épigénome du foie foetal** par immunoprécipitation de la chromatine était une suite logique aux travaux concernant l'expression des gènes du foie foetal, publiés en 2016 (Panchenko et al. 2016), mettant en évidence notamment des modifications d'expression de gènes d'enzymes de la machinerie épigénétique. Les marques épigénétiques étant nombreuses et variées, nous avons conduit une analyse de la littérature et des bases de données, au regard des résultats publiés en 2016 par l'équipe (Panchenko et al. 2016), afin de sélectionner la marque la plus cohérente à analyser. Je détaille les recherches bibliographiques et les analyses par western blot réalisées à ce propos dans la seconde partie des résultats.

La partie Résultats de ce manuscrit présentera les méthodes mises en œuvre et les résultats originaux des analyses de leptinémie et d'AFM, et de métabolomique (Partie 1) et d'épigénétique (partie 2) sur les descendants issus des mères du projet TPMP. Les résultats, les méthodes et leurs limites feront ensuite l'objet d'une discussion, quant aux effets (bénéfique ou non) sur la santé de la descendance, d'une perte de poids maternelle préconceptionnelle, dans un contexte initial d'obésité maternelle.

# **RESULTATS**

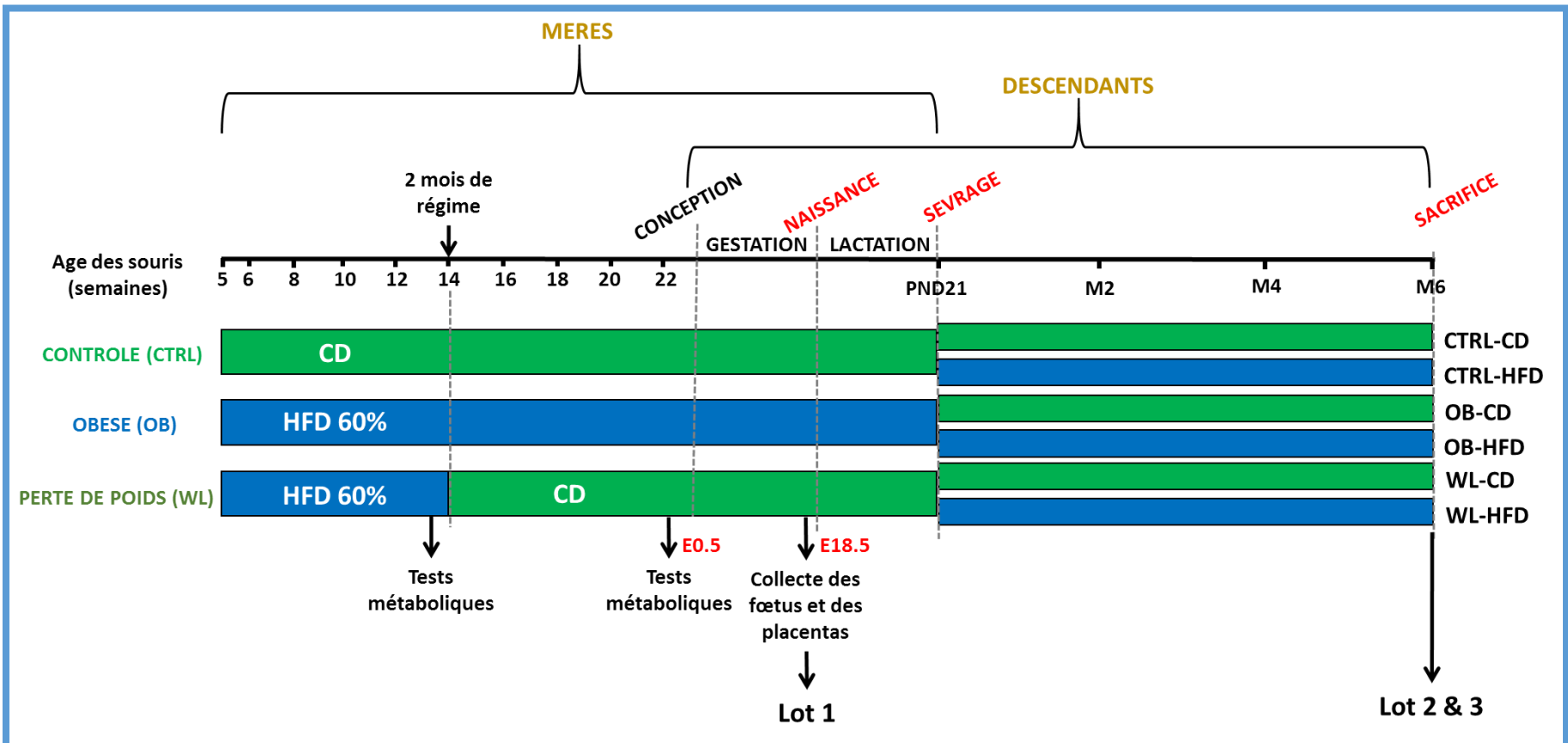


Figure 43. Modèle animal expérimental de trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles

Des souris de souche C57BL/6J ont été nourries par un régime équilibré (CD, barres vertes) ou riche en lipides (HFD, barres bleu). Un premier groupe de femelles était sous régime CD (CTRL) et un deuxième groupe sous régime HFD (OB). Pour le troisième groupe, après deux mois sous régime HFD, le régime a été remplacé par un régime CD (WL). Après 4 mois de régime, les femelles ont été mises à l'accouplement avec des mâles de la même souche, sous régime CD. Un premier lot de descendants a été prélevé au stade fœtal, en fin de gestation (E18.5). Un second lot de descendants a été suivi jusqu'à 6 mois après la naissance. Au sevrage, un régime CD ou HFD a été attribué aléatoirement à ces descendants afin d'obtenir six groupes : CTRL-CD, CTRL-HFD, OB-CD, OB-HFD, WL-CD et WL-HFD. Un suivi longitudinal a été effectué chez descendants, le poids et la prise alimentaire ont été mesurés deux fois par semaine et les paramètres métaboliques ont été évalués au sevrage, à 2, à 4 et à 6 mois.

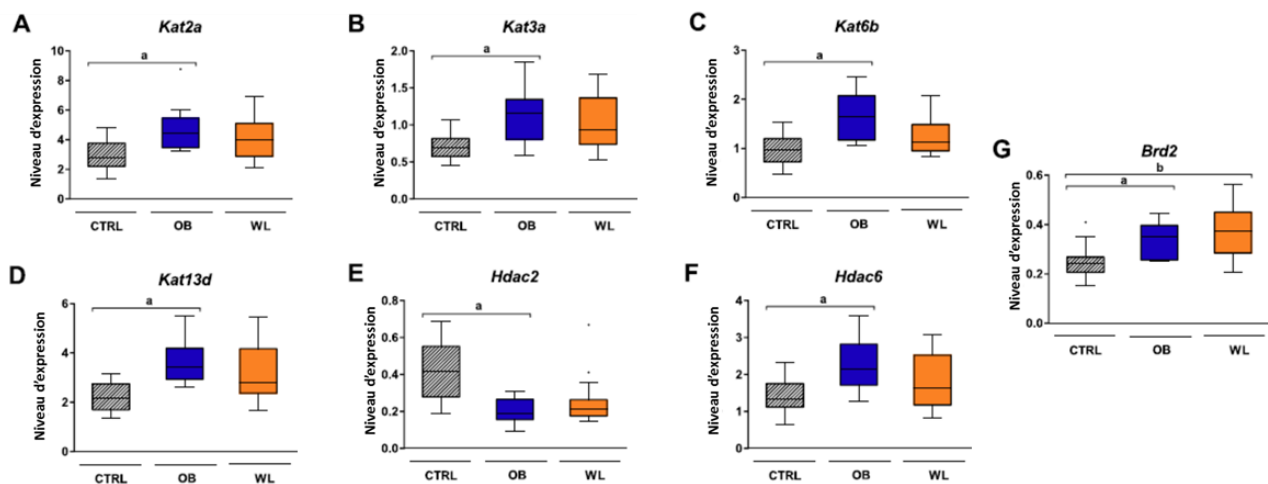
# Résultats

## 1) Modèle Trajectoires Pondérales Maternelles Préconceptionnelles (TPMP)

Le projet Trajectoires Pondérales Maternelles Préconceptionnelles (TPMP) avait pour objet de comprendre les mécanismes moléculaires et métaboliques du conditionnement développemental de la descendance par l'obésité maternelle. Le second objectif était de savoir si une correction de l'obésité maternelle, par une perte de poids préconceptionnelle, pouvait améliorer le phénotype de la descendance.

### 1.1) Rappel du protocole expérimental et des résultats antérieurs

Un modèle animal, constitué d'un groupe de femelles contrôles, d'un groupe de femelles obèses et d'un groupe de femelles obèses ayant perdu du poids a été constitué au laboratoire. Le **groupe contrôle (groupe CTRL)** a été nourri avec un régime équilibré (**CD**, *control diet*, 10% lipides, 70% carbohydrates et 20% protéines). L'obésité a été induite chez les femelles (**groupe OB**), grâce à un régime **HFD** (60% lipides, 20% carbohydrates et 20% protéines), donné 4 mois avant la conception, pendant la gestation et la lactation. Afin de faire maigrir les femelles obèses, un retour au régime CD a été effectué deux mois avant la mise à la reproduction (**groupe WL**, *weight loss*) (**Figure 43**). Ces régimes ont été maintenus pendant la gestation et la lactation. Dans cette étude, les deux premiers mois du régime HFD ont permis d'induire une augmentation de poids significative (+27%), une hyperglycémie, une intolérance au glucose et une hypercholestérolémie. Les femelles obèses, ainsi obtenues, ont ensuite été réparties en deux groupes, OB et WL. Les femelles du groupe OB ont été maintenues sous régime obésogène et elles ont présenté un phénotype d'obésité sévère (augmentation du poids de 36% par rapport aux CTRL), une dyslipidémie et un phénotype de type diabétique (hyperglycémie et intolérance au glucose). Le changement de régime des femelles du groupe WL pour le régime contrôle a eu pour effet d'entraîner une perte de poids significative (surpoids persistant de 5% au moment de la mise à la reproduction), associée à une normalisation de tous les paramètres métaboliques qui étaient altérés chez les femelles du groupe OB (Panchenko et al. 2016). Ainsi, la croissance folliculaire et la production d'ovocytes matures se sont déroulées dans un contexte métabolique contrasté pour chacun des



**Figure 44. Expression différentielle de gènes de la machinerie épigénétique en fonction du groupe maternel dans le foie fœtal à E18.5.**

L'expression de 60 gènes de la machinerie épigénétique a été évaluée par la méthode de TaqMan low-density arrays. En comparaison du groupe contrôle (CTRL), l'expression de *Kat2a* (A), *Kat3a* (B), *Kat6b* (C), *Kat13d* (D), *Hdac2* (E), *Hdac6* (F), and *Brd2* (G) est affectée par l'obésité maternelle (OB). La perte de poids maternelle préconceptionnelle (WL) ne permet pas la normalisation de l'expression de ces gènes et augmente significativement l'expression de *Brd2* (G).

a : p-adj < 0.05 OB vs. CTRL ; b : p-adj < 0.05 WL vs. CTRL.

Adapté de Panchenko et al. 2016

groupes F0, CTRL, OB et WL. Ces trois groupes de femelles F0 ont été accouplées avec des mâles sous régime contrôle et leur gestation s'est déroulée sous leur régime propre.

Dans un premier lot de femelles, les fœtus et leur placenta ont été prélevés à E18.5 pour étudier les effets du métabolisme maternel sur le développement fœto-placentaire et l'expression des gènes de la machinerie épigénétique. Dans un second lot selon le même protocole nutritionnel pour les régimes maternels des F0, le phénotype des descendants a été suivi de la naissance à l'âge adulte (6 mois), afin de déterminer les effets de ces régimes à plus long terme (**Figure 43**). Après sacrifice des animaux, différents organes et tissus ont été prélevés et conservés en vue d'une analyse moléculaire ultérieure.

### **Effet sur le développement fœto-placentaire.**

L'obésité maternelle a provoqué une restriction de croissance fœtale à E18.5. Ce phénotype était associé à une perturbation de la réponse transcriptionnelle dans le foie fœtal. Les gènes de la machinerie épigénétique impliquée dans l'acétylation des histones ont été particulièrement affectés par l'obésité maternelle (**Figure 44**). La perte de poids et la normalisation des paramètres métaboliques de la mère en préconception ont permis une restauration complète du poids fœtal, accompagnée d'une expression génique normalisée pour certains gènes, mais intermédiaire entre celle des descendants des femelles obèses et des femelles contrôles pour d'autres gènes (**Figure 44**). Ces travaux ont mis en évidence l'effet bénéfique d'une intervention nutritionnelle, en amont de la conception. La perte de poids a permis d'améliorer la croissance fœtale et l'expression génique, sans toutefois assurer une correction complète des effets de l'obésité préconceptionnelle.

### **Effet sur le phénotype de la descendance en post-natal.**

Après sevrage, les souriceaux (F1 mâles et femelles) ont été répartis aléatoirement en 2 groupes : 1 groupe d'animaux sous régime contrôle CD et un groupe d'animaux sous régime obésogène HFD (challenge alimentaire), pour caractériser le phénotype en termes de programmation et de conditionnement, respectivement. Les **effets sur le phénotype à l'âge adulte** ont été évalués sur plusieurs paramètres physiologiques, biométriques, biochimiques et métaboliques à divers âges après le sevrage: glycémie à jeun, insulinémie, cholestérolémie, tolérance au glucose, consommation alimentaire, préférence à l'odeur d'aliment HFD ou CD présenté simultanément, performances olfactives dans un test de sensibilité général dit « test du cookie caché », excitabilité de la muqueuse olfactive par électro-olfactogramme (EOG), poids corporel au sacrifice et poids d'organes et de tissus adipeux rapportés au poids corporel



(foie, cœur, reins, tissu adipeux brun, tissus adipeux blanc péri-gonadique, péri-rénal, sous-cutané et total). Les résultats principaux ont indiqué que les mâles nés de mère obèse développaient une obésité accrue par rapport à leurs congénères sous régime HFD, tandis que la perte de poids préconceptionnelle normalisait ce phénotype.

## **1.2) Analyses complémentaires**

Ma contribution dans cette étude a été de réaliser les mesures de leptinémie ainsi que l'intégration des données phénotypiques à l'aide d'analyses factorielles multiples.

### **1.2.1) Dosage de la leptine sérique**

Pour compléter la description phénotypique des descendants, nous avons mis en place des analyses de leptinémie. En effet, la leptine est une hormone anorexigène sécrétée par le tissu adipeux blanc et dont la sécrétion est généralement accrue en cas d'obésité, signe d'une résistance à la leptine (Carobbio, Pellegrinelli, et Vidal-Puig 2017). Du fait de son importance dans la régulation des fonctions cérébrales, en particulier l'hypothalamus et le bulbe olfactif, il paraissait indispensable de caractériser l'évolution de la leptinémie des descendants. Dans le sérum des descendants mâles et femelles prélevé à l'âge de 2, 4 et 6 mois, la leptinémie a été mesurée par un test ELISA en utilisant le kit Leptin Mouse/Rat ELISA (#RD291001200R, BioVendor Laboratory Medicine, Brno, Czech Republic). Les données obtenues ont été analysées par ANOVA. En post-sevrage, l'effet principal était porté par le régime individuel : les individus **HFD** des deux sexes présentaient une hyperleptinémie à 2, 4 et 6 mois. En revanche, nous avons montré que les descendants **OB** et **WL** ne différaient pas des descendants **CTRL** pour ce paramètre. Par ailleurs, le groupe maternel n'a pas eu non plus d'effet sur l'évolution de la leptinémie chez les individus quel que soit le sexe entre 2 et 6 mois après le sevrage (**Figure 3M de l'article**).

### **1.2.2) Analyse factorielle multiple (AFM)**

Afin de prendre en compte l'ensemble des paramètres phénotypiques mesurés, d'évaluer les interactions entre variables et d'en déterminer les plus pertinentes pour expliquer les différences entre groupes de descendants à l'âge adulte, nous avons conduit des analyses factorielles multiples (**AFM**). L'AFM est la méthode factorielle adaptée à l'étude des tableaux dans lesquels un ensemble d'individus est décrit par un ensemble de variables (quantitatives

et/ou qualitatives) structurées en groupes/classes. Le cœur de l'AFM repose sur une analyse factorielle (analyse en composante principale (ACP) dans le cas de nos variables qui sont quantitatives) dans laquelle les variables sont pondérées. Ces poids sont identiques pour les variables d'une même classe et varient d'une classe à l'autre. Cela permet d'éviter l'introduction de biais lié au nombre de variables au sein de chaque groupe ou à une corrélation entre les variables d'un même groupe. Nous avons choisi de répartir les variables en trois classes : « Biométrie » incluant le poids corporel et le poids des organes rapporté au poids corporel ; « Biochimie » incluant la glycémie à jeun, l'insulinémie, la cholestérolémie, la tolérance au glucose et la leptinémie ; « Comportement » incluant la prise alimentaire, la préférence vis-à-vis de l'aliment, la sensibilité olfactive et les données d'EOG.

Les premières analyses nous ont permis de conclure à un effet majeur du sexe et du régime post-sevrage (**Figure 7 A de l'article**). De nouvelles AFM ont été menées en séparant les descendants en fonction du sexe et du régime post-sevrage, afin de pouvoir faire ressortir l'effet du groupe maternel dans chaque condition.

- Le groupe maternel n'a pas eu d'effet sur l'ensemble des variables analysées pour la descendance femelle, quel que soit le régime post-sevrage,
- De la même façon, le régime maternel n'a eu aucun effet sur l'ensemble des variables analysées pour la descendance mâle, sous régime CD (**Figure 7 B, C, D de l'article**).
- En revanche, les individus mâles sous régime HFD étaient séparés en fonction de leur groupe maternel (**Figure 7 E de l'article**). Le regroupement hiérarchique réalisé sur ces individus montrait une différence entre les groupes maternels OB et WL ( $\chi^2$  test,  $p = 0,0234$ ), confirmant la séparation des groupes (ellipse de confiance) sur le graph des individus. La séparation entre les descendants OB et WL s'effectuait sur les deux premières dimensions (42,5% de la variabilité), avec une association (OB :  $p = 0,044$  ; WL :  $p = 0,047$ ) de ces groupes maternels avec la deuxième dimension (14,4% de la variabilité) (**Figure 7 E de l'article**). La classe de variable représentant le mieux la première dimension était la « Biochimie » ( $r^2 > 0,8$ ) et la seconde dimension était représentée par la « Biométrie » ( $r^2 > 0,45$ ) (**Figure 7 F de l'article**). Le « Comportement » était le mieux représenté sur la troisième dimension ( $r^2 > 0,6$ ) et contribuait aux différences sur la première dimension ( $r^2 > 0,6$ ). Sur la première dimension (28,1% de la variabilité) du graphe des variables, les descendants OB étaient associés aux variables leptinémie, poids relatif du foie, cholestérolémie, poids corporel et TAB sous-cutané ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ), tandis que les descendants WL étaient associés aux variables prise alimentaire et TAB péri-gonadique ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ). Sur la deuxième dimension,

les descendants OB étaient associés à l'insulinémie ( $p < 7 \times 10^{-10}$ ) et les descendants WL à la préférence à l'odeur des aliments ( $p < 6 \times 10^{-6}$ ) (**Figure 7 G de l'article**).




Par conséquent, dans les deux sexes, l'effet majeur était dû au régime post-sevrage. De façon intéressante, les trajectoires de poids maternel avaient une influence sur le phénotype de la progéniture, uniquement chez les mâles exposés à un régime HFD.

En résumé, l'ensemble de l'étude longitudinale menée sur la descendance a permis de montrer que l'effet majeur sur le phénotype des descendants des deux sexes était porté par le régime post-sevrage, induisant des modifications au niveau métabolique, comportemental et olfactif. Cependant, l'obésité maternelle a également entraîné, chez la descendance mâle, une aggravation du phénotype d'obésité sous régime HFD. Nous avons de plus montré que la perte de poids maternelle préconceptionnelle normalisait la survie et le profil métabolique de la progéniture. De façon intéressante et inattendue, les changements métaboliques maternels préconceptionnels du groupe WL ont induit une réduction de la sensibilité de la muqueuse olfactive de la descendance mâle, sans modification de tout autre paramètre. L'ensemble de ces données a été valorisée par la rédaction de l'article «Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice» publié dans la revue *Nutrients* en 2019 ([Panchenko et al. 2019 ; ci joint](#)), en particulier les Figures 3m (Leptinémie) et Figure 7 (AFM).

### **1.3) Article «Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice»**

Article

# Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice

Polina E. Panchenko <sup>1,†</sup>, Marie-Christine Lacroix <sup>2,†</sup>, Mélanie Jouin <sup>1</sup>, Sarah Voisin <sup>1</sup>, Karine Badonnel <sup>2</sup>, Marion Lemaire <sup>1</sup>, Nicolas Meunier <sup>2</sup>, Sofiane Safi-Stibler <sup>1</sup>, Marie-Annick Persuy <sup>2</sup>, Luc Jouneau <sup>1</sup>, Didier Durieux <sup>2</sup>, Simon Lecoutre <sup>3</sup>, Hélène Jammes <sup>1</sup>, Delphine Rousseau-Ralliard <sup>1</sup>, Christophe Breton <sup>3</sup>, Claudine Junien <sup>1</sup>, Christine Baly <sup>2</sup> and Anne Gabory <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France; polina.panchenko@bristol.ac.uk (P.E.P.); melanie.jouin@inra.fr (M.J.); sarah.voisin.aeris@gmail.com (S.V.); marionlemaire@laposte.net (M.L.); sofiane.safi-stibler@inra.fr (S.S.-S.); luc.jouneau@inra.fr (L.J.); helene.jammes@inra.fr (H.J.); delphine.rousseau@inra.fr (D.R.-R.); claudine.junien@inra.fr (C.J.)

<sup>2</sup> NBO, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France; mclacroixkann@gmail.com (M.-C.L.); karine.badonnel@inra.fr (K.B.); nicolas.meunier@inra.fr (N.M.); marie-annick.persuy@inra.fr (M.-A.P.); didier.durieux@inra.fr (D.D.); christine.baly@inra.fr (C.B.)

<sup>3</sup> Équipe Malnutrition Maternelle et Programmation des Maladies Métaboliques, EA4489, Université de Lille, 59000 Lille, France; 23simon.lec@gmail.com (S.L.); christophe.breton@univ-lille1.fr (C.B.)

\* Correspondence: anne.gabory@inra.fr; Tel.: +331-34-65-23-48

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 29 March 2019; Accepted: 24 April 2019; Published: 26 April 2019



**Abstract:** According to the “developmental origins of health and disease” (DOHaD) concept, maternal obesity predisposes the offspring to non-communicable diseases in adulthood. While a preconceptional weight loss (WL) is recommended for obese women, its benefits on the offspring have been poorly addressed. We evaluated whether preconceptional WL was able to reverse the adverse effects of maternal obesity in a mouse model, exhibiting a modification of foetal growth and of the expression of genes encoding epigenetic modifiers in liver and placenta. We tracked metabolic and olfactory behavioural trajectories of offspring born to control, obese or WL mothers. After weaning, the offspring were either put on a control diet (CD) or a high-fat (HFD). After only few weeks of HFD, the offspring developed obesity, metabolic alterations and olfactory impairments, independently of maternal context. However, male offspring born to obese mother gained even more weight under HFD than their counterparts born to lean mothers. Preconceptional WL normalized the offspring metabolic phenotypes but had unexpected effects on olfactory performance: a reduction in olfactory sensitivity, along with a lack of fasting-induced, olfactory-based motivation. Our results confirm the benefits of maternal preconceptional WL for male offspring metabolic health but highlight some possible adverse outcomes on olfactory-based behaviours.

**Keywords:** obesity; preconceptional weight loss; olfaction; programming; DOHaD; metabolism

## 1. Introduction

Obesity is the 5th largest risk factor for mortality and is associated with severe conditions such as cardiovascular diseases, stroke, type-2 diabetes, dyslipidaemia, sleep disorders, hepatic steatosis, osteoarthritis, cancer and neurocognitive defects [1,2]. In addition, obesity-induced olfactory impairments have been described in human [3] and in several animal models [4–6], pointing at a tight

link between olfaction and metabolism imbalance (reviewed in [7]). An excessive body mass index (BMI,  $\text{weight/height}^2$ ) is considered a risk factor for loss of olfaction and eating disorders [8–10].

The “developmental origins of health and disease” (DOHaD) concept states that obese women give their children an increased risk of developing non-communicable diseases (NCDs) in adulthood. Early exposure to various exogenous or endogenous changes during preconceptional period, gestation, lactation or childhood and adolescence affect long-term health [11–13]. It is known that maternal nutrition affects the offspring’s non-homeostatic regulation of food intake, but its consequences on offspring olfactory performance have poorly been investigated in the DOHaD context (see [7] for review). Yet, the perinatal period is crucial for the development of the olfactory system that is already functional in utero and that displays anatomical and functional neuroplasticity to achieve its maturity at the end of the third postnatal week in rodents [14]. The olfactory system is thus likely to be affected by maternal diet with consequences on food intake behavior, associated or not with impairments in olfactory sensitivity. However, curiously, handful of animal studies have examined the consequences of maternal energy deficit or surplus on offspring’s olfaction. Undernourishment throughout gestation and suckling results in functional immaturity of the offspring’s olfactory system, leading to both short- and long-term deficiencies in odour discrimination [15,16]. Moderate maternal caloric restriction during pregnancy led to a sex-specific decrease of an endocannabinoid neurotransmitter in the main olfactory bulb of female offspring [17]. To our knowledge, very few studies were done in obese context. Very recently, a deleterious effect of a maternal high-fat and high-sugar diet on male offspring’s olfactory performances at weaning has been demonstrated [18]. It is thus highly conceivable that maternal nutrition and weight changes might influence olfactory-based behaviour in offspring, potentially impacting their long-term food preferences and intake, as previously reported [19,20].

Obesity is also associated with reproductive issues such as infertility, obstetrical complications, birth defects and stillbirth [21]. When limited weight gain during pregnancy was advised to obese mothers to improve these outcomes, there were only small effects on foetal growth and metabolic outcomes [22,23]. A preconceptional weight loss (WL) is now widely recommended to obese women, improves fertility and reduces the occurrence of metabolic complications [24]. However, whereas some studies demonstrate a positive impact [25–28], other studies indicate potential deleterious effects [28–30]. Interestingly, none of these studies followed up the metabolic development of these children and adolescents and additional studies are therefore needed to reveal the long-term health profiles of offspring born to obese mothers who lost weight prior to conception [31,32]. In two rat models, a nutritional intervention in obese dams was beneficial to the offspring, even if all parameters were not normalized [33,34]. In sheep, a strict nutritional intervention before mating had long-term benefits on offspring weight gain but deleterious effects on offspring stress response and glucose metabolism [35,36]. WL following bariatric surgery in humans [37–39], or diet reversal in rodents [5], showed mixed results on olfactory performance, suggesting that alterations to olfaction are difficult to reverse.

Further work is required to determine the effect of maternal preconceptional BMI and WL on metabolic outcomes and olfactory behaviour related to food intake in the offspring. To our knowledge, no study has investigated the contribution of either maternal obesity linked to high fat consumption or preconceptional WL on the preservation, improvement or impairment of olfactory performance in the offspring at different ages, and with a focus on sex differences. Here, we evaluated whether a preconceptional WL may be used as a therapeutic tool to reverse the adverse effects caused by a gestational obesity (OB) on offspring’s phenotype, using a previously described animal model developed in our laboratory [40]. Metabolic and behavioural trajectories of male and female offspring until adulthood were followed, under two post-weaning macronutrient options: a control (CD) or a high-fat diet (HFD). We confirmed the main effect of post-weaning diet on the offspring metabolism and olfaction. However, we showed that maternal obesity and weight loss also influence the next generation phenotype, with sex-specificities. Male offspring born to obese mother presented a worsened diet-induced obesity than their counterparts born to lean mothers. Preconceptional WL normalized the

offspring metabolic phenotypes but had unexpected effects on olfactory performance with a reduction in olfactory sensitivity, along with a lack of fasting-induced, olfactory-based motivation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animal Experiment Procedures

The COMETHEA ethical committee (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale), registered with the Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale under the n°45, approved this protocol (visa 12/062), in accordance with European Union (Directive 2010/63/EU, 22 September 2010) legislation and the National charter on the ethics of animal experimentation.

Four-week-old female and 7-week-old male C57Bl/6J mice were purchased from Harlan Laboratory (Venray, Netherlands) and housed in IERP animal holding facilities (Unité d'Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons; INRA, Jouy-en-Josas, France) at controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C) with a 12 h light/12 h dark cycle. Mice had ad libitum access to water and food and paper towel was provided for nest building. After one week of adaptation, mice were placed in individual cages and randomly assigned to either the high-fat diet (HFD) or the matched control diet (CD, Table 1). Food was purchased in pellet form, stored at 4 °C and replaced weekly to prevent degradation. Macronutrient and micronutrients (vitamins, salts, etc.) in these diets are balanced to the caloric content, because rodents adjust their caloric intake. Generations F0 and F1 mice were weighted and food intake was recorded twice a week. Relative caloric intake (kcal/kg of body weight/day) was calculated for each mouse.

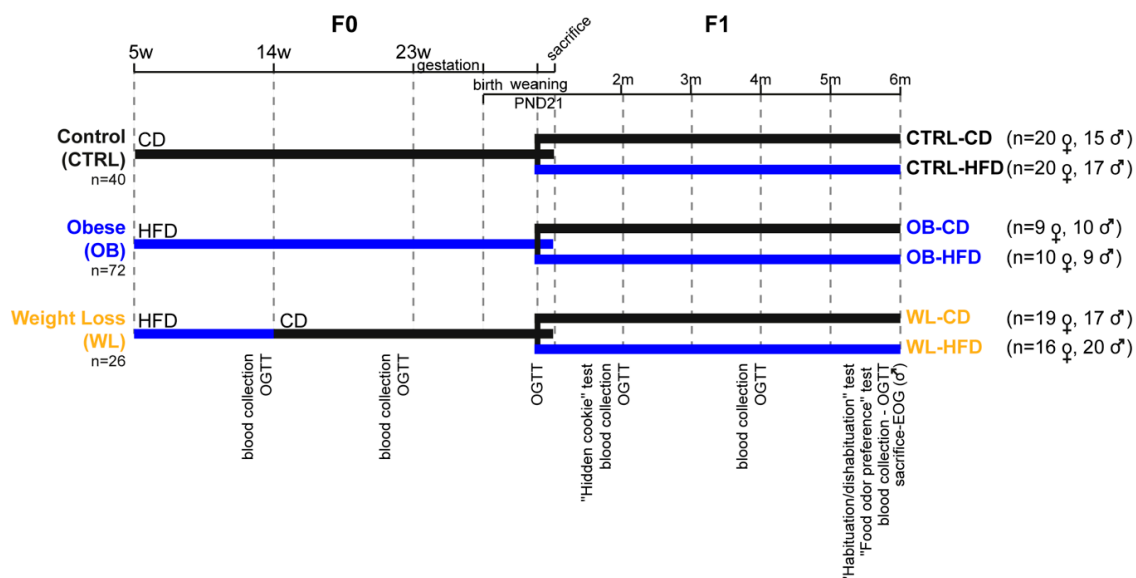
**Table 1.** Diet composition of the CD and HFD formulas (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA).

Formula	CD		HFD	
	#D12450K		#D12492	
Composition	g	kcal	g	kcal
Protein	19.2	20%	26.2	20%
Carbohydrate	67.3	70%	26.3	20.1%
Fat	4.3	10%	34.9	59.9%
Total		100%		100%
Energy (kcal/g)	3.85		5.24	
Ingredient	g	kcal	g	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn starch	550	2200	0	0
Maltodextrin 10	150	600	125	500
Sucrose	0	0	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Soybean oil	25	225	25	225
Lard	20	180	245	2205

CD, control diet; HFD, high-fat diet.

We used two different season-matched F0 cohorts. From 5 weeks of age, mice of the control group received CD for the 4 months in preconception period (CTRL  $n = 40$ ; Figure 1). The others received the HFD ( $n = 98$ ). At 14 weeks, after 2 months of HFD, mice with a weight above the threshold of mean CTRL weight +2 standard deviations, were considered to be obese [41] and one female out of two was assigned to CD for the next two months of experimental procedure (Figure 1) in order to induce a weight loss (WL group,  $n = 26$ ). The remaining mice stayed on HFD to develop a chronic obesity (OB group,  $n = 72$ ). Measurements of fasting cholesterolemia, glycaemia, insulinemia, leptinemia and oral glucose tolerance test (OGTT) were performed at the age of 13 and 22 weeks. From 23 weeks of age, females were mated with chow-fed C57BL/6J males (#801030 RM3A; Special diets services,

Witham, Essex, UK) for one night. If no vaginal plug was observed, females were mated with another male according to their estrus cycle. The reproduction period lasted for 6 weeks. Females remained on their experimental diets throughout pregnancy and lactation. At E16.5, litter was last changed in the cage and nestlets were provided. All female mice gave birth by spontaneous vaginal delivery.



**Figure 1.** Experimental protocol for studying the effects of maternal periconceptional and postweaning diets on offspring. Female C57BL/6J F0 mice were fed a high-fat (HFD, blue bars) or a control (CD, black bars) diet. After 2 months, a subset of HFD mice was assigned to CD for the next 2 months in order to induce a weight loss (WL group). The remaining mice stayed on HFD to induce a chronic obesity (OB group). Control mice (CTRL) received CD for the 4 months. Females were mated and remained on their experimental diets through pregnancy and lactation. At weaning, male and female offspring were randomly assigned onto CD or HFD: 6 F1 groups were thus obtained. All mice were monitored for body weight and food intake. F0 were sacrificed one week after weaning and F1 were sacrificed at 6 months of age. The schedule of blood collection (leptin and cholesterol measures), metabolic (oral glucose tolerance test, OGTT) and olfactory behavioural tests (“hidden cookie”, “habituation/dishabituation”, “food odour preference” tests and electro-olfactogram, EOG) is indicated. *n*, individual number per group; *w*, the week of age; *m*, the month of age; PND, post-natal day.

At postnatal day (PND) 1, litters were reduced to six pups when necessary. Litter was changed in the cage at PND7 and F1 were weighed every 2 days until PND21. Then, male and female offspring were randomly fed a CD or HFD to obtain 6 F1 groups (Figure 1): CTRL-CD, CTRL-HFD, OB-CD, OB-HFD, WL-CD and WL-HFD. Measurements of fasting cholesterolemia, glycaemia, insulinemia and Oral Glucose Tolerance Tests (OGTT) were performed at weaning and 2, 4 and 6 months. A battery of behavioural tests was conducted in the following order: a hidden cookie test (age: 2 months), a habituation/dishabituation test (5.5 months) and a food odour preference test (6 months, Figure S1, Methods S1). One OB mother and its 4 pups were removed from the experiment since it had lost more than 20% of its weight before the beginning of gestation.

## 2.2. Assessment of Glucose Metabolism

After 6 h fasting (8:00 a.m. to 2:00 p.m.), a bolus of glucose (2 g/kg body weight) was delivered into the stomach of conscious mice using a gavage probe. Glycaemia was measured prior glucose delivery (T0) and at 20, 40, 60, 90 and 120 min. Insulinemia was measured at 0, 20 and 60 min, except for the F1 mice at weaning, for whom only at fasting (T0) insulinemia was measured. The trapezoidal method was used to calculate the area under the curve (AUC) (auc function of the flux package in R) considering only values above the fasting level. Glycaemia from tail vein blood was measured in duplicate using



an Accu-Chek Performa blood glucose meter (Roche diagnostics GmbH, Germany). Tail vein blood (30 µL) was collected in microvette tubes (Rajouter la ville, Sarstedt, Nümbrecht, Germany), centrifuged for 10 min at 2000 g at 4 °C. Insulinemia was measured with Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA (#80-INSMSU, AlpcO, Salem, NH, USA), according to the manufacturer's instruction. Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated as: fasting glycaemia (mol/L) × insulinemia (mol/L)/22.4.

### 2.3. Assessment of Lipid Metabolism

At 2:00 p.m., after 6 h fasting, submandibular vein blood (300 µL) was collected from conscious mice in tubes containing 5 U.I. of heparin (Choay heparin, Sanofi-aventis, Paris, France). Samples were centrifuged for 10 min at 1500× g at 20 °C, plasma collected and stored at −20 °C. For F0, total cholesterol level was measured by colorimetric dosage on Ortho Vitros Clinical Chemistry System instrument in Ambroise Paré Hospital (Boulogne-Billancourt, France). For F1, cholesterolemia was measured by enzymatic CHOD-PAP (cholesterol oxidase: p-aminophenazone) method (#WCHO100, Sobioda, Montbonnot-Saint-Martin, France). Leptinemia was measured with Leptin Mouse/Rat ELISA (#RD291001200R, BioVendor Laboratory Medicine, Brno, Czech Republic) according to the manufacturer's guidelines.

### 2.4. Assessment of Body Composition

At 6 months of age, F1 mice were weighed and sacrificed by cervical dislocation after 5–8 h fasting (from 8:00 a.m. to 13:00–16:00 p.m.). The weight of following tissues was recorded: subcutaneous (Sc), perirenal (Pr) and perigonadal (Pg) white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), liver, kidney and heart. Organ weights are presented relative to body weight (%).

### 2.5. Olfactory Behavioural Experiments

All behavioural tests were performed during the light phase, at 2:00 p.m., with water and food available, except when mentioned. Data were collected by experimenters blind to diet groups.

#### 2.5.1. The Olfactory Sensitivity Test (Hidden Cookie Test)

It was performed as described previously in rats with slight modifications [4]. Mice were familiarized with their own experimental cage (4 cm bedding, 1 h/day) for 3 days. On the fourth day, mice were tested with an unscented square tile hidden under the bedding to evaluate their curiosity and anxiety-based digging behaviours (referenced as experimental day D0). The next four consecutive days and twice a day at 1 h intervals, mice were dropped off in the middle of their experimental cage, where two 5-mm pieces of cheese had been hidden under the bedding in a random corner of the cage, changed at every trial. Time for cheese-retrieving (in seconds) was recorded for 5 min. Cheese was deemed to be found when the mice were holding it or if at least 10% of it was visible. If the cheese was not found, time was considered 300 s and the piece was given to the mouse. All mice consumed the cheese after the first day. The scores of the two daily trials were averaged. Between each trial, animals were put back in their home cages. From D1 to D3, mice were tested in the fed state; on D4, mice were tested after 8 h fasting, first with the unscented tile square, then with the cheese.

#### 2.5.2. Habituation/Discrimination Test

The capacity of mice to discriminate two chemically distinct odorants was measured as described [42], in a large plastic experimental cage (40 cm × 25 cm × 14.5 cm) in which a flat plastic board with four holes were bored at each corner of the board (2 cm diameter, 3 cm from the edge) and left in a one-hole configuration. A glass container was placed under the open hole with a piece of Whatman paper, covered with a half tea-ball metallic protection, so that mice could not touch it. Six-hour fasted mice were familiarized with the experimental setup in a 2 min trial without odorant.



The test consisted of successive presentations (2 min each) of a Whatman paper soaked with 60  $\mu$ L of mineral oil (twice, odourless control), pentanol (0.074% *v/v*; four times, habituation), followed by decanal (1.78% *v/v*; once, discrimination). The time spent sniffing the hole (in seconds) was manually recorded. Between each presentation, animals returned in their cage for 5 min. Animals that did not display any sniffing during the test were removed from the statistical analysis (4 CTRL-CD, 4 CTRL-HFD, 3 OB-CD, 2 OB-HFD, 4 WL CD and 3 WL-HFD males; 2 CTRL-CD, 2 CTRL-HFD, 2 OB-CD, 1 OB-HFD, 3 WL-CD and 1 WL HFD females).

## 2.6. Electro-Olfactogram (EOG)

EOG recordings were performed from the centre of turbinates IIb and III of the olfactory epithelium in an opened nasal cavity configuration on male mice during light phase (2:00–5:00 p.m.) as already described [43]. Heptaldehyde was tested at serial dilutions ranging from 1:100,000 to 1:1000 in mineral oil (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Peak amplitude was measured. For organizational reasons, EOG was performed only in males, which presented a more pronounced metabolic phenotype according to maternal group.

## 2.7. Statistics

The data were analysed using the R software. Male and female offspring were tested separately as there was sexual difference for most phenotypes. For all tests, an adjusted *p*-value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

For metabolic data, as variances were unequal, data were Boxcox transformed, using the `powerTransform` and `bcPower` functions of the `car` package and analysed with a likelihood-ratio test, using the `lrtest` function of the `lmer` package, and adjusted with the Benjamini and Hochberg (BH) correction for multiple comparisons using the `p.adjust` function. Linear mixed models were used to model the evolution of metabolic phenotypes with time, using the `lmer` function of the `lme4` package. Estimates of the slopes for each phenotype were reported as “ $\beta$ ” and coded as `Phenotype = Group + Time + Group  $\times$  Time + random(ID  $\times$  Time)` and `Phenotype = Group + Time + Diet + Diet  $\times$  Time + Group  $\times$  Time + Group  $\times$  Diet  $\times$  Time + random(ID  $\times$  Time)` for F0 and F1 respectively, where “Group” is the maternal group (CTRL, OB or WL), “Diet” is the F1 post-weaning diet (CD or HFD), “Time” is the timepoint and “`random(ID  $\times$  Time)`” is a random intercept and slope component for repeated measures. We used ANOVA to test for differences at each timepoint, using the `aov` function followed with Tukey’s post hoc test, coded as `Phenotype = Group` or `Phenotype = Group + Diet + Group  $\times$  Diet` for F0 and F1 respectively. Effect size was reported as the proportion  $R^2$  of the variance in the phenotype of interest. The PCA function of the `FactoMineR` package was used in F0 dams.

For olfactory scores, the distribution of the variance was heterogeneous, so nonparametric statistics were performed. N-ways ANOVAs were done using the `aovp` function of the `Permutation Tests for Linear Models (lmp)` package, with factors: `Groups  $\times$  Diet` in Figure 4a and `Group  $\times$  Diet  $\times$  fasting` in Figure 4c, `Group  $\times$  Diet  $\times$  Odorant` in Figure 5 (discrimination) and `Group  $\times$  Diet  $\times$  Odorant dilution` in Figure 6; or the nonparametric analysis longitudinal data (`nparLD`) package [44] with `Groups  $\times$  Diet` as whole plot factors in and `Days` in Figure 4b or `Odorant presentations` in Figure 5 (habituation) as a subplot. Post-hoc tests (`coin` package) followed by BH correction were performed: `symmetry-test` (Figure 4b), `Wilcoxon test` (Figure 4b and Figure 5) and the two-sample Fisher-Pitman permutation test for comparative analysis of two independent diet group (Figure 4), stratified by dose (Figure 6).

A multiple factor analysis (MFA) was performed in F1 generation on a set of 18 variables regrouped in 3 variable categories (biochemistry, biometry and behaviour), using the `FactoMineR` package [45]. “Biochemistry” grouped the last measure of fasting glycaemia, insulinaemia, cholesterolemia and leptinemia, and glycemic AUC in OGTT. “Biometry” grouped the organ to body weight ratio for BAT, Pr-WAT, Pg-WAT, Sc-WAT, Total-WAT, Liver, Heart and Kidney, and week-24.5 body weight. “Behaviour” grouped the week-23 relative caloric intake, day-1 hidden-cookie test retrieving time, HFD filled hole preference ratio and EOG at dose 0.001. Hierarchical clustering analysis followed by a

$\chi^2$  and a v.test, which is a normalized difference between the average of the individuals of a class and the general average, corroborated the graphical results. Significance is reached when  $\chi^2 p < 0.05$  and v.test  $> 1.96$  in absolute value. In the variables factor map, for a given dimension, the variables most correlated to the dimension are close to the circle. Significance is reached when  $r^2 > 0.6$  in absolute value and  $p < 0.05$ .

### 3. Results

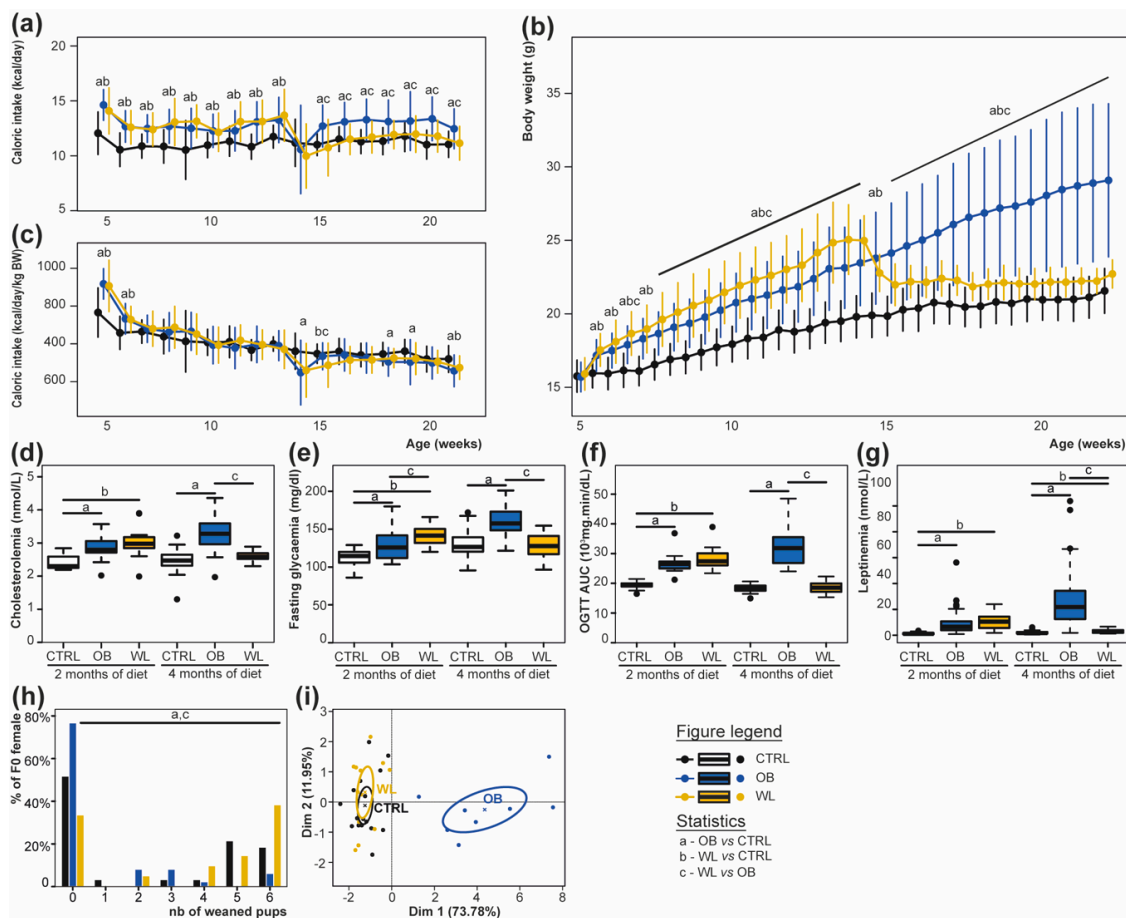
#### 3.1. Preconceptional Weight Loss Normalizes the Metabolic Profile of Obese Dams

As expected, dams under HFD had a greater caloric intake than dams under CD (Figure 2a). As a result, dams of the obese group (OB) were heavier than those of the control group (CTRL) at each time point from week 5.5 onwards, reaching +38% overweight before mating (all  $p < 0.05$ ) (Figure 2b). Dams from the WL group were heavier than CTRL at each time point up to dietary intervention (all  $p < 0.05$ , Figure 2b). As soon as 3 days after switching HFD to CD and up to mating, WL females weighed less than OB (all  $p < 0.05$ ). Nevertheless, WL dams remained +5% heavier than CTRL in the preconception period and at mating (all  $p < 0.05$ ) (Figure 2b). Diet explained 25% of the variance in weight at week 5.5 (half a week after HFD exposure) and 61% of the variance at week 22 (4 months of diet). Interestingly, caloric intake relative to body weight was similar in the three groups at most time points in the preconception period (all  $p > 0.05$ ), indicating a normal regulation of feeding behaviour of HFD-fed dams (Figure 2c). After 2 months under HFD, OB and WL dams were hypercholesterolemic, hyperleptinemic, hyperglycemic and glucose intolerant (all  $p < 0.05$ , see Figure 2d–g). At mating, OB dams conserved these disturbances (all  $p < 0.05$ ), while all WL dams normalize these metabolic parameters except leptinemia (all  $p > 0.05$  vs. CTRL, see Figure 2d–g). There was no extreme- or non-respondent WL individual.

#### 3.2. Pup Survival Is Impaired by Maternal Obesity and Normalized by Maternal Weight Loss

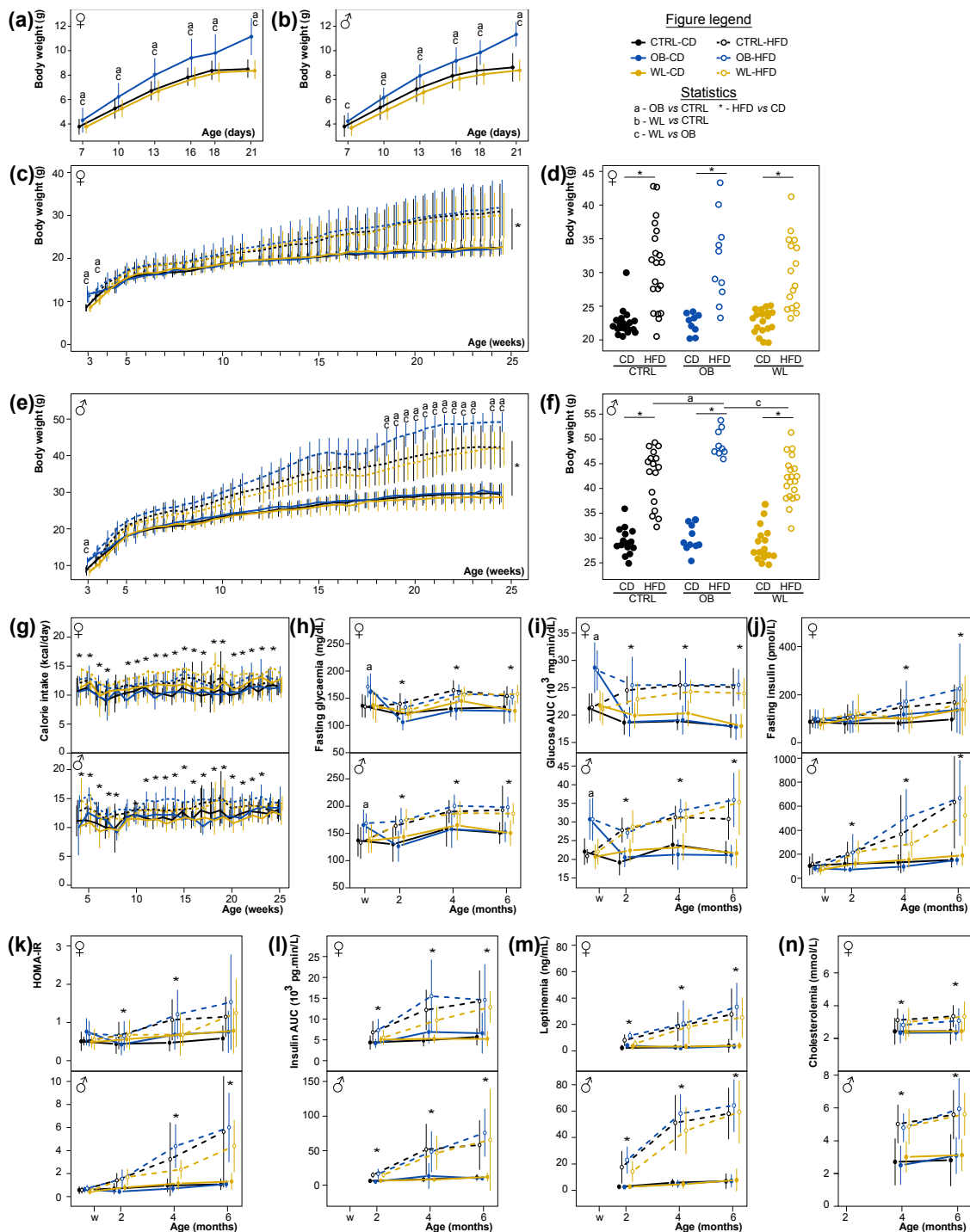
The average crossing time (CTRL  $3.3 \pm 2.2$  days; OB  $2.8 \pm 1.8$  days; WL  $2.9 \pm 1.7$  days, Kruskal–Wallis test  $p = 0.8$ ) and the percentage of gestation loss (CTRL 6%; OB 4%; WL 9%, logistic regression  $p = 0.71$ ) were similar for the three groups of dams. Gestation time was similar between groups (CTRL  $19.5 \pm 0.6$  days; OB  $19.8 \pm 0.9$  days; WL  $19.4 \pm 0.5$  days; Kruskal–Wallis test,  $p = 0.09$ ). We observed that the maternal group had a major effect on mortality of pups during the first postnatal week: CTRL and WL dams had more litters where at least one pup was weaned, compared with OB dams (48% for CTRL, 24% for OB and 67% for WL). Moreover, OB dams weaned fewer pups per delivered litter than CTRL or WL females (Figure 2h;  $p = 0.00017$ ; post hoc test: OB vs. CTRL  $p = 0.017$ ; WL vs. CTRL  $p = 0.39$ ; WL vs. OB  $p = 0.0002$ ). At sacrifice, one week after weaning, OB dams had an increased Sc, Pg, Pr and total WAT's relative weight ( $p < 0.001$ ), and a decreased kidney's, heart's and liver's relative weight than CTRL dams ( $p < 0.001$ ; Table S1). There was no difference between CTRL and WL. Principal Component Analysis was performed on all maternal parameters measured on dams after weaning at sacrifice (weight, WAT and BAT, kidneys', heart's and liver's relative weights). CTRL and WL dams clustered together, away from OB dams on dimension 1 that explained 68.5% of the variance (Figure 2i).

Therefore, maternal obesity was associated with an increased pup mortality, while preconceptional WL normalized offspring survival.



### 3.3. Early Post-Natal Growth Curve Is Normalized by Maternal Preconceptional Weight Loss

We previously showed that maternal obesity induced foetal growth restriction (FGR:  $-13\%$ ) and increased the proportion of SGA fetuses ( $+28\%$ ) at term of gestation. This effect was corrected in WL dams [40]. As the pup's survival was impaired in the early postnatal period, we only weighed the offspring starting from PND7 to avoid maternal abandonments. During the pre-weaning period, the offspring born to OB dams put on weight faster than CTRL ( $\beta = 0.13$ ,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ). Maternal group influenced the male and female offspring weight, with OB differing from both CTRL and WL, except for PND7 males, where OB only differed from WL (Figure 3a,b).



**Figure 3.** Male offspring born to OB mothers develop increased diet-induced obesity, WL offspring are not distinguishable from CTRL. F1 weight during the lactation period (a), female and (b), male,  $n =$  CTRL F:43, M:36, OB F:20, M:19, WL F:36, M:37) and evolution of body weight from weaning to 6 months of age ((c), female and (e), male,  $n =$  CTRL-CD F: 16–20, M: 12–15, CTRL-HFD F: 12–17, M: 13–17, OB-CD F: 7–10, M: 8–11, OB-HFD F: 7–11, M: 7–10, WL-CD F: 15–19, M: 11–17, WL-HFD F: 13–16, M: 14–20). Scatter plot of weight at week 24.5 to illustrate the distribution of the data ((d) females and (f) males). Evolution of food intake after weaning (g), fasting glycemia (h), OGTT glucose AUC (i), fasting insulinemia (j), HOMA-IR (k), OGTT insulin AUC (l), leptinemia (m), cholesterolemia (n) at weaning, 2, 4 and 6 months of age, represented as mean  $\pm$  SD,  $n =$  CTRL-CD F: 13–20, M: 8–16, CTRL-HFD F: 13–21, M: 5–17, OB-CD F: 5–9, M: 8–10, OB-HFD F: 7–10, M: 7–9, WL-CD F: 7–19, M: 5–17, WL-HFD F: 6–17, M: 8–20 depending on age and investigated parameters.

### 3.4. Maternal Obesity Has Few Persistent Effects after Weaning and Preconceptional Weight-Loss Does Not Induce a Specific Metabolic Phenotype in the Offspring

After weaning, half of the offspring was fed a HFD and the other half a CD (Figure 1). The pre-weaning effects of the maternal group quickly disappeared and the F1 own post-weaning diet explained the majority of the metabolic phenotypes. For females, mice fed a HFD gained more weight than animals fed a CD as expected ( $\beta = 0.42$ ,  $p = 2.9 \times 10^{-14}$ , Figure 3c). OB offspring were heavier than CTRL offspring at weeks 3 ( $p = 2.0 \times 10^{-12}$ ) and 3.5 ( $p = 0.032$ , Figure 3c) and gained weight slower than CTRL from week 3 to 6 ( $\beta = -0.65$ ,  $p < 0.001$ , Figure 3c). From week 6 to 25, there was no difference in growth curves and adult weight was not different according to maternal groups in F1 females ( $p = 0.75$ ; Figure 3c,d). HFD-fed males also gained more weight than CD-fed as expected ( $\beta = 0.65$ ,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ). OB males were heavier than CTRL males at week 3 ( $p = 0.000056$ , Figure 3e) and gained weight slower than CTRL until week 6 ( $\beta = -0.84$ ,  $p < 0.001$ , Figure 3e). In F1 males only, there was an interaction between post-weaning diet, maternal group and time, with OB-HFD males gaining weight faster than CTRL-HFD males ( $\beta = 0.28$ ,  $p = 0.01$ , Figure 3e). This interaction became significant after 18.5 weeks (all raw  $p$ -values  $< 0.05$ ): OB-HFD males were 10.5% heavier than CTRL-HFD (Figure 3e,f). There was no difference in body weight between F1 born to WL and CTRL dams. The OB maternal effect was modest compared to the effect of the post-weaning diet, as maternal group explained only 2% of the variance at 6 months of age. However, among the HFD-fed male offspring, maternal group explained 26% of the variance in body weight.

HFD-fed female and male offspring ate more calories than CD-fed ( $p < 0.05$  for most time points, Figure 3g), with no additional effect of maternal group. At weaning, male and female OB F1 had higher fasting glucose ( $p = 2.6 \times 10^{-11}$ , Figure 3h), and presented impaired glucose tolerance (higher AUC in OGTT,  $p = 3.48 \times 10^{-26}$ ) compared with CTRL F1 (Figure 3i). For all parameters, WL offspring did not differ from CTRL animals. After weaning, the main effect is the own individual diet, with HFD-fed mice showing hyperglycemia, increased insulinemia and insulin resistance (HOMA-IR), decreased glucose tolerance (AUC), hypercholesterolemia and hyperleptinemia measured at 2, 4 and 6 months (Figure 3h–n), pointing at an impairment of glucose and lipid metabolism. The maternal group had no more effect on glucose and lipid metabolisms, nor on the evolution of the parameters between 2 and 6 months of age in both sexes (Figure 3h–n). A noticeable interaction between maternal group and post-weaning diet was visible at month 4 for fasting glycaemia in female, with WL-CD close to HFD-fed mice levels ( $p = 0.046$ , Figure 3h), for fasting insulin in males with WL-HFD close to CD-fed mice levels ( $p = 0.0028$ , Figure 3j) and for HOMA-IR, with WL-HFD close to CD-fed values ( $p = 0.043$  in female and  $p = 0.004$  in males, Figure 3k). However, this effect was not accompanied by glucose intolerance in month 4, as there was no statistical interaction in OGTT AUC measures, and was transitory, as it was no more observed at 6 months of age. Body composition at sacrifice was evaluated. Adiposity (Sc, Pg, Pr and total WAT) was increased under HFD in both sexes as expected (Table S1). Body composition was not affected by maternal group in F1 females (Table S1). In F1 males, there was an effect of maternal group on kidneys' and heart's weight: OB F1 had heavier kidneys and heart than WL ( $p = 0.001$  and  $p = 0.0061$  respectively; Table S1).

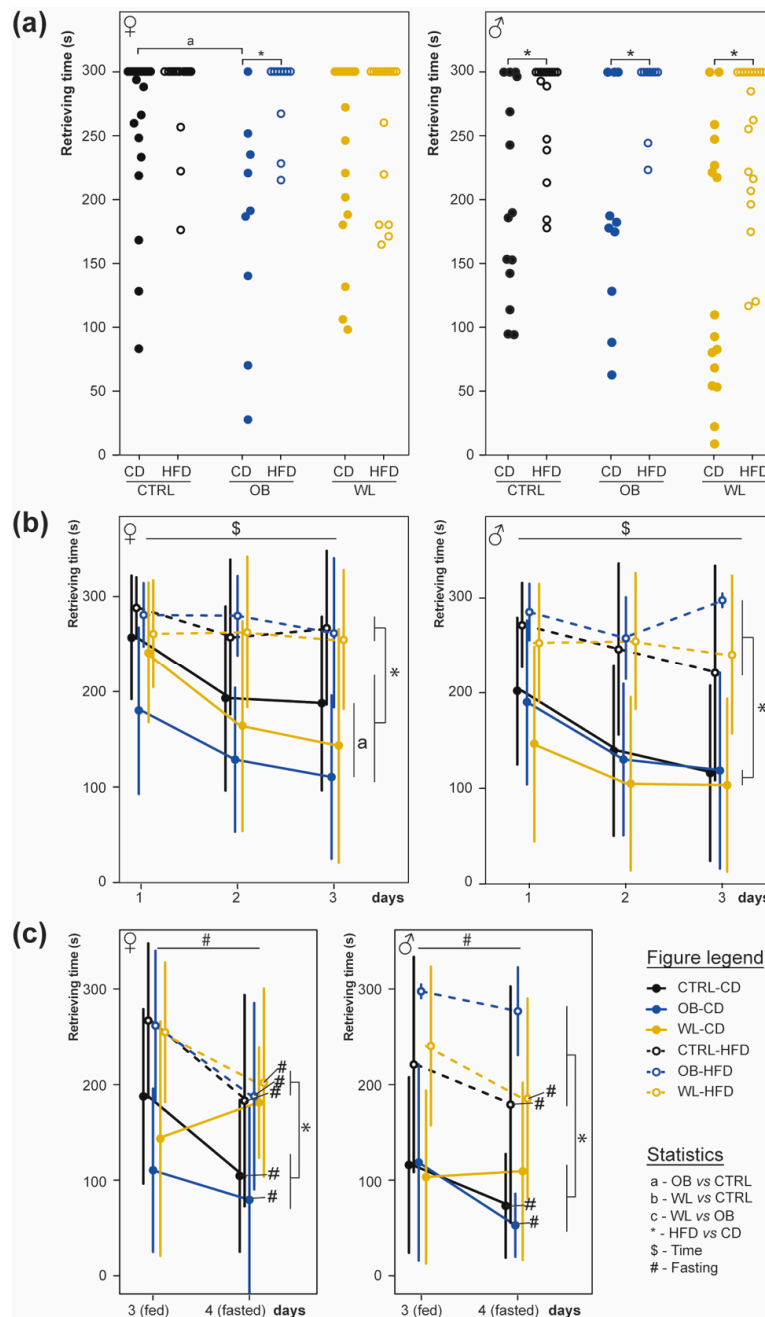
### 3.5. Post-Weaning HFD Offspring Display Poor Olfactory Performance

At 2 months of age, a hidden-cookie test was performed to measure the effect of maternal group and post-weaning diet on olfactory sensitivity. Maternal group, post-weaning diet and sex did not influence the offsprings' digging activity towards a non-scented tile square, neither in fed state at the beginning nor in fasted state at the end of the experimental procedure.

The time required to find the piece of cheese under the litter was analysed on the first experimental day (D1; Figure 4a). In female offspring, both maternal group ( $p = 0.03$ ) and post-weaning diet ( $p = 0.0005$ ) influenced retrieving time, with an interaction between factors ( $p = 0.04$ ; Figure 4a left). HFD increased retrieving time in mice born to OB mothers (OB-CD vs. OB-HFD,  $p = 0.01$ ; CTRL-CD vs. CTRL-HFD  $p = 0.12$ ; WL-CD vs. WL-HFD,  $p = 0.4$ ). Furthermore, CD mice born to OB dams displayed



faster retrieving times (CTRL-CD vs. OB-CD  $p = 0.03$ ). This effect was not observed in WL group (OB-CD vs. WL-CD,  $p = 0.5$ ). In males, only post-weaning diet affected retrieving time ( $p = 2 \times 10^{-16}$ , Figure 4a right). Therefore, post-weaning diet highly influenced naive mice olfactory performance to localize the piece of cheese and this effect was modulated by maternal diet in female mice, the OB-CD females were indeed the best-performing group at this test.



**Figure 4.** High fat post-weaning diet decreases mice performances in a general anosmia test. The hidden-cookie test measured the effect of maternal and post-weaning diet on general olfactory acuity at 2 months, after 4–5 weeks of post-weaning diet. The test was performed for 3 days (two averaged trials per day) in a fed state and on the 4th day after 8-h fasting. Latencies to find the buried cheese on the first day (a), their evolution between day 1 and 3 (b) and between day 3 (fed) and 4 (fasted) (c) are presented as scatterplots or mean  $\pm$  SD for female (left; CTRL-CD  $n = 19$ , CTRL-HFD  $n = 20$ , OB-CD  $n = 9$ , OB-HFD  $n = 10$ , WL-CD  $n = 18$ , WL-HFD  $n = 16$ ) and male (right; CTRL-CD  $n = 15$ , CTRL-HFD  $n = 16$ , OB-CD  $n = 10$ , OB HFD  $n = 9$ , WL-CD  $n = 16$ , WL-HFD  $n = 20$ ) mice.

The evolution of olfactory performance was evaluated by repeating the test three days in a row (Figure 4b). For both sexes, there was an effect of day (females,  $p = 0.004$ ; males,  $p = 0.0003$ ) and post-weaning diet (females,  $p = 5 \times 10^{-16}$ ; males,  $p = 8 \times 10^{-24}$ ), with an interaction between these factors (females  $p = 0.049$ ; males  $p = 0.029$ ). CD-fed mice displayed shorter retrieving time and improved their performance over time ( $p = 2.7 \times 10^{-4}$ ), while HFD-fed mice did not ( $p = 0.47$ ). In females, there was also an effect of maternal group (females,  $p = 0.042$ ; males  $p = 0.17$ ) and interaction between maternal group and post-weaning diet (females,  $p = 0.039$ ; males  $p = 0.39$ ). Concerning CD-fed mice, OB females were more performant than CTRL ( $p = 4 \times 10^{-4}$ ), but there were no WL vs. OB and CTRL vs. OB differences ( $p = 0.1$  and  $0.06$  respectively, Figure 4b). There were no between-group differences in HFD-fed females ( $p = 0.8, 0.4$  and  $0.33$  respectively). Post-weaning HFD thus impaired olfactory learning/memory performance between D1 and D3 and, in females, OB mice fed a CD were the best-performing.

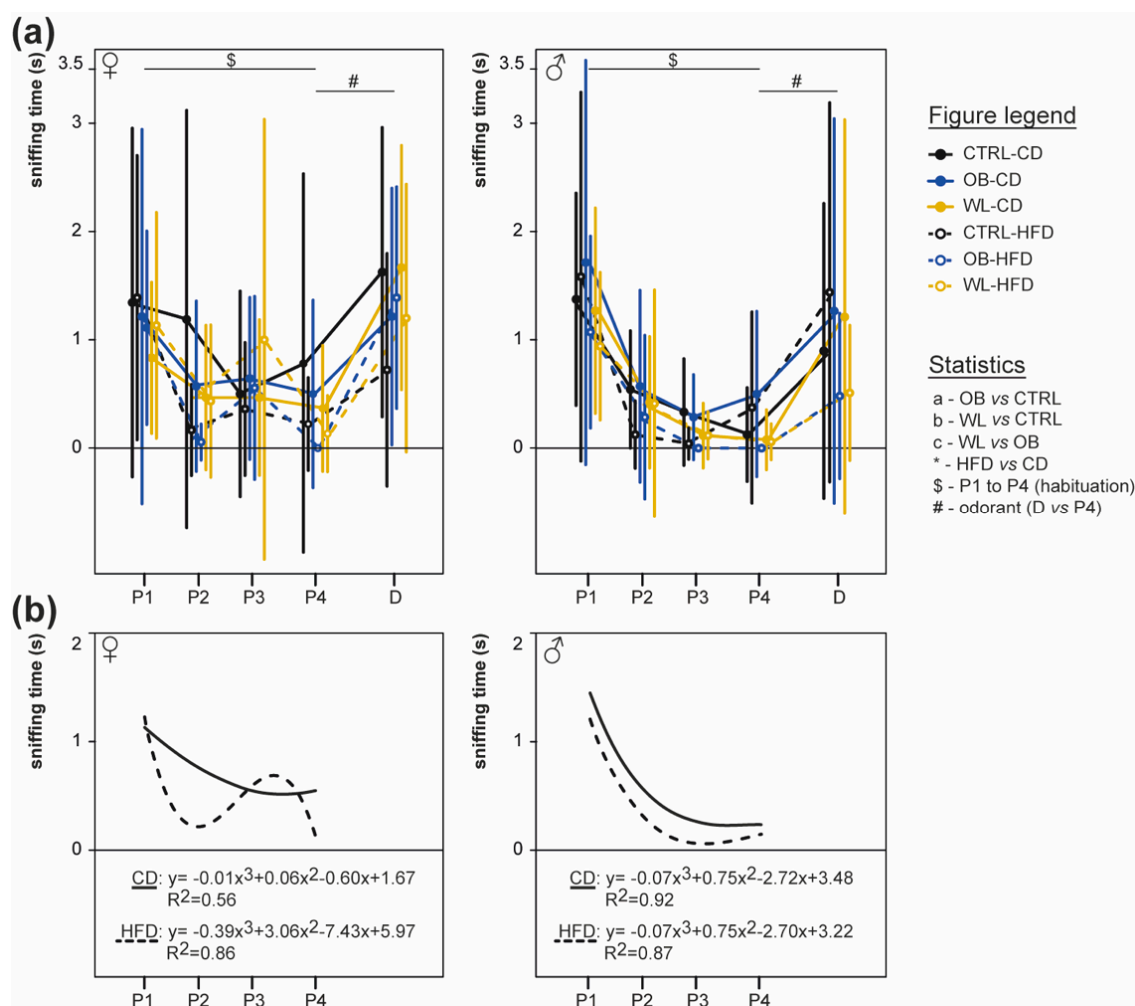
On the D4, we tested whether fasting could improve chemosensory performances depending on the group (Figure 4c). In females, there was no effect of maternal group, but an effect of both the post-weaning diet ( $p = 3.5 \times 10^{-8}$ ), fasting ( $p = 3 \times 10^{-9}$ ), as well as an interaction between maternal group and fasting ( $p = 4 \times 10^{-3}$ ) and between post-weaning diet and fasting ( $p = 6 \times 10^{-3}$ , Figure 4c left). Fasting improved performance in CTRL-CD, CTRL-HFD, OB-CD, OB-HFD and WL-HFD ( $p = 2 \times 10^{-3}$ ,  $p = 2 \times 10^{-4}$ ,  $p = 0.05$ ,  $p = 0.03$ ,  $p = 0.006$  respectively), but not WL-CD ( $p = 0.09$ ). In males, a post-weaning diet and fasting effects were observed ( $p = 4 \times 10^{-16}$  and  $p = 6 \times 10^{-7}$ ), as well as an interaction between maternal group and post-weaning diet ( $p = 0.03$ , Figure 4c right). Fasting shortened retrieving time in CTRL-CD, CTRL-HFD, OB-CD and WL-HFD ( $p = 0.02$ ,  $p = 0.06$ ,  $p = 0.03$ ,  $p = 0.02$  respectively), but not in OB-HFD and WL-CD ( $p = 0.25$  and  $p = 0.1$ ). In both sexes, fasted mice on HFD still displayed the worse performance regardless of maternal group (Figure 4c) but fasting had no effect on WL-CD mice.

### 3.6. Post-Weaning Diet Influences Odour Habituation Capacities in Females

At 5.5 months of age, we tested whether maternal group or post-weaning HFD influences the habituation of mice to four repeated presentations of pentanol (Figure 5). In both sexes, there was no effect of the maternal group (female  $p = 0.96$ ; male  $p = 0.66$ ). In females, there was a global effect of odorant repetition ( $p = 3 \times 10^{-14}$ ) and an interaction between odorant presentation and post-weaning diet ( $p = 0.03$ , Figure 5a left). Both CD- and HFD-fed mice habituate (CD,  $p = 0.004$ ; HFD,  $p = 1 \times 10^{-5}$ ), but CD-fed mice showed a continuous diminution of sniffing time between P1 and P4, whereas HFD-fed mice showed a slight increase at P3 (Figure 5b left). In males, there was an effect of odorant repetition ( $p = 2 \times 10^{-30}$ ) and a post-weaning diet effect ( $p = 0.005$ , Figure 5a right): all males displayed odorant habituation and the HFD fed males sniffed less than CD (Figure 5b right).

As all animals displayed odorant habituation whatever their sex, maternal group or post-weaning diet, we tested the mice's ability to discriminate two odorants by presenting a new odorant (decanal) as fifth presentation. Comparative analysis of sniffing time between the fourth pentanol and the decanal presentation showed that mice globally discriminated between these two odorants (females  $p = 2 \times 10^{-16}$ ; males  $p = 2 \times 10^{-16}$  Figure 5a), with neither effect of maternal group (females  $p = 0.94$ ; males  $p = 0.64$ ) nor post-weaning diet (females  $p = 0.08$ ; males  $p = 0.19$ ).

Therefore, post-weaning diet had sex-specific effects on odorant habituation.

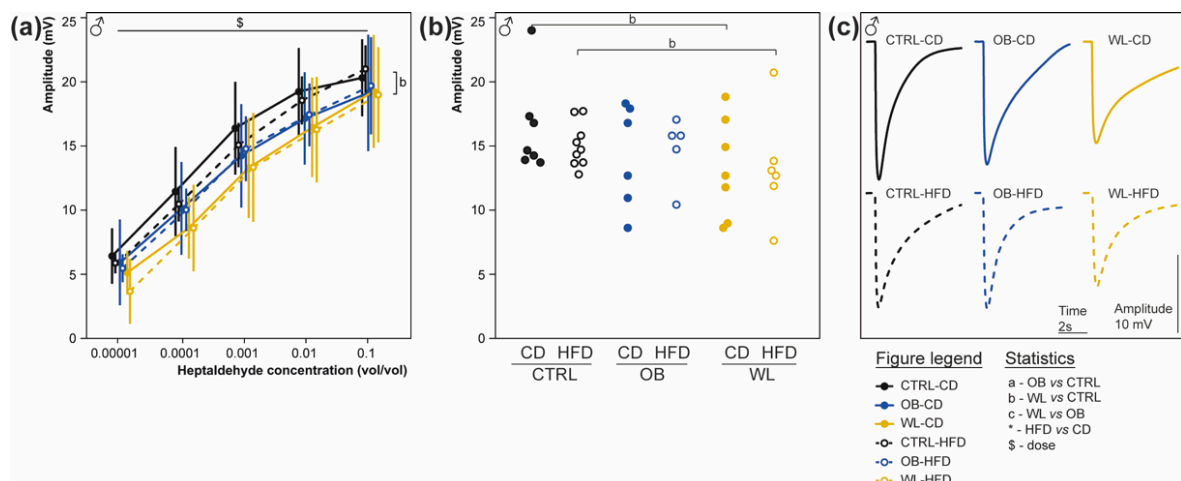


**Figure 5.** Olfactory discrimination is influenced by maternal and post-weaning diets. The habituation/discrimination test measured the ability to discriminate between a sequentially presented set of odours (four successive presentations of pentanol (P1–P4), followed by decanal (D)) at 5.5 months, after 18 weeks of CD or HFD diet. The exploration time for mice in response to the odorant presentation is given as mean  $\pm$  SD (a) for female (left; CTRL-CD  $n = 17$ , CTRL-HFD  $n = 18$ , OB-CD  $n = 7$ , OB-HFD  $n = 9$ , WL-CD  $n = 15$ , WL-HFD  $n = 15$ ) and male (right; CTRL-CD  $n = 11$ , CTRL-HFD  $n = 12$ , OB-CD  $n = 7$ , OB-HFD  $n = 7$ , WL-CD  $n = 12$ , WL-HFD  $n = 17$ ). Regression curves for CD-fed and HFD-fed mice during habituation (P1–P4; (b)) for females (left) and male (right).

### 3.7. Maternal Weight Loss Decreases the Amplitude of the Electrical Response of Olfactory Epithelium to a Non-Food Odorant

At 6 months of age, we performed EOG recordings on male's olfactory epithelium (OE) to analyse the amplitude of electrophysiological responses to the application of increasing heptaldehyde (HEP) concentrations from the 6 groups (Figure 6). Amplitude of the OE electrical response increased with the odorant concentration for all groups ( $p = 2 \times 10^{-16}$ ). Not the post-weaning diet ( $p = 0.74$ ), but the maternal group had an impact on the responses to odorants ( $p = 0.012$ ), with no interaction (Figure 6). Offspring born to WL mothers displayed decreased response amplitudes to HEP compared with offspring born to CTRL (WL CD vs. CTRL-CD,  $p = 0.014$ ; WL-HFD vs. CTRL-HFD,  $p = 0.005$ ), but not compared with offspring born to OB (WL-CD vs. OB-CD  $p = 0.38$ ; WL-HFD vs. OB-HFD  $p = 0.16$ ). There was no difference between OB and CTRL. Therefore, there was a decrease in the olfactory sensitivity for a non-food odorant of offspring born to WL dams, whatever the post-weaning diet.



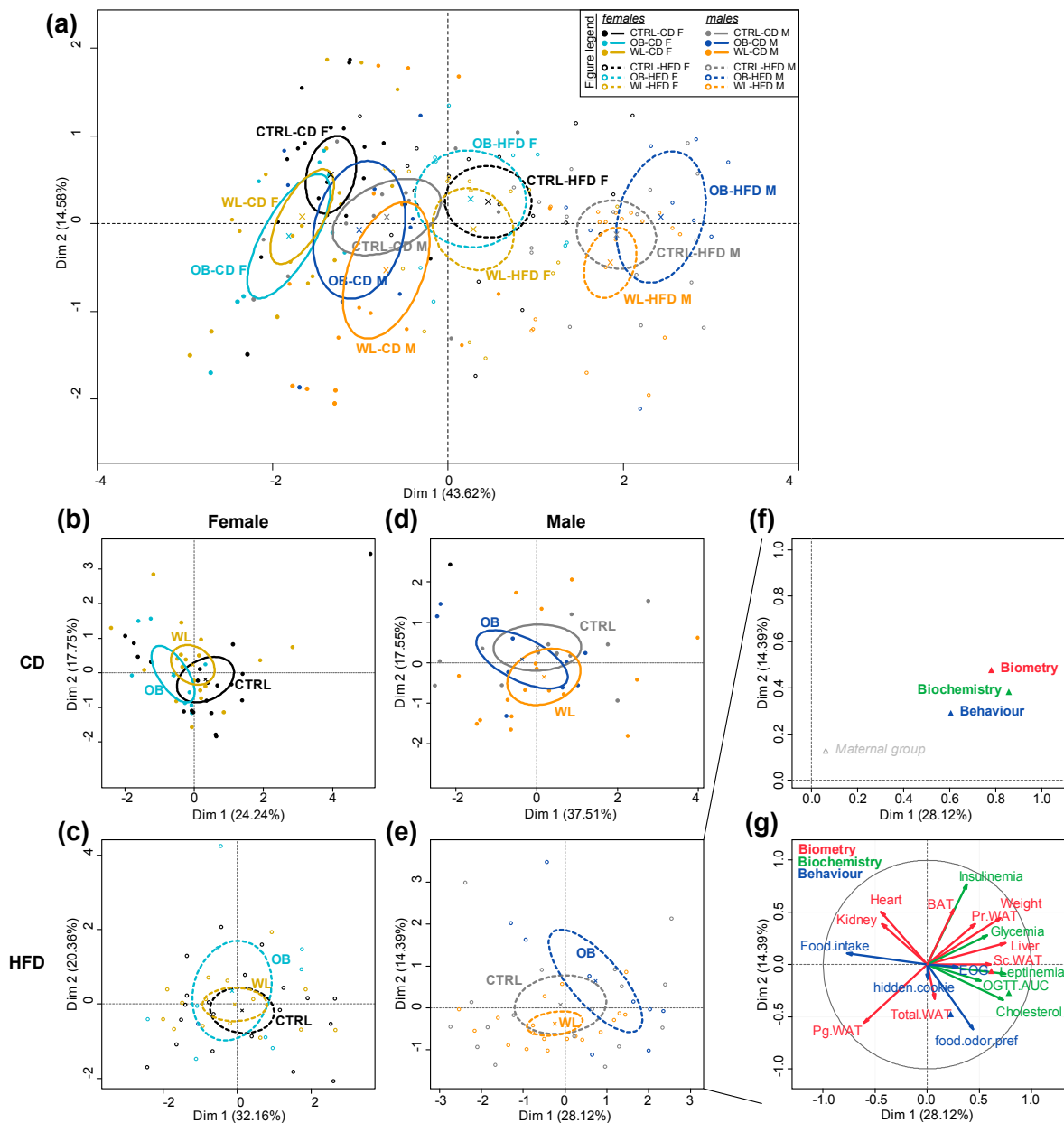


**Figure 6.** Weight loss decreases the electrical response of the olfactory epithelium to heptaldehyde in male. Electroolfactograms (EOG) recordings were obtained from olfactory epithelium (OE) from male mice at sacrifice at 6 months, after 23–25 weeks of post-weaning diet. The amplitudes of the EOG responses after successive application of increasing concentrations of HEP on both OE turbinates IIb and III are represented as mean  $\pm$  SD for male mice ((a): CTRL-CD,  $n = 7$ ; CTRL-HFD,  $n = 9$ ; OB-CD,  $n = 6$ , OB-HFD,  $n = 5$ , WL-CD,  $n = 7$  and WL-HFD,  $n = 6$ ). Scatterplot representation (b) and typical trace (c) of EOG responses to heptaldehyde at 1:1000 in mineral oil are given for the 6 groups.

### 3.8. Post-Weaning Diet Has a Major Effect on F1 Phenotype and HFD-Fed Males Are Additionally Influenced by Maternal Group

To get a global overview of the effect of maternal group on offspring health, we performed a multiple factor analysis (MFA) on all the data previously described. Variables were separated into three classes: “Biochemistry”, “Biometry” and “Behaviour”. In line with the previous results, there was a major effect of sex and post-weaning diet (Figure 7a). We therefore performed the MFA on mice split by sex and post-weaning diet to better reveal the effect of maternal group. While there was no effect of the maternal group neither in females (Figure 7b,c) nor in CD-fed males (Figure 7d), maternal groups separated on the HFD-fed male chart (Figure 7e). A hierarchical clustering of the individuals was performed and showed a difference between maternal groups ( $\chi^2$  test,  $p = 0.0234$ ), with an anti-correlation of the OB group (v.test =  $-2.533$ ;  $p = 0.011$ ). Separation between OB and WL offspring occurred on the two first dimensions (42.5% of the variability) with an association (OB  $p = 0.044$ ; WL  $p = 0.047$ ) of these maternal groups to the second dimension (14.4% of the variability; Figure 7e). The most representative variable group to the first dimension was “Biochemistry” ( $r^2 > 0.8$ ) and the second dimension was represented by “Biometry” ( $r^2 > 0.45$ ; Figure 7f). “Behaviour” was mostly represented in the third dimension ( $r^2 > 0.6$ ) and contributed to the differences in the first dimension ( $r^2 > 0.6$ ). On the first dimension of the graph of variables (28.1% of the variability), OB offspring were associated to variables leptinemia, liver relative weight, cholesterolemia, body weight and Sc WAT ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ), while WL offspring were associated with variables food intake and Pg WAT ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ) (Figure 7g). On the second dimension, OB offspring were associated with insulinemia ( $p < 7 \times 10^{-10}$ ) and WL offspring with food odour preference ( $p < 6 \times 10^{-6}$ ) (Figure 7g).

Therefore, in both sexes, post-weaning diet had a major effect. More interestingly, the maternal weight trajectories influenced the offspring’s phenotype in HFD-fed males.



**Figure 7.** Multiple factor analysis (MFA) reveals an influence of maternal group on HFD-fed males. “Biometry”, “Biochemistry” and “Behaviour” data from females and males were analysed by MFA. Plot ellipses with their barycentre for maternal group are represented on the two first dimensions of the MFA for all the offspring (a), females (b,c) and males (d,e) and according to post-weaning diet CD (b,d) or HFD (c,e). Correlation ( $r^2$ ) of the variables groups to the two dimensions of the MFA is represented on the categories correlation graph (f) and correlation ( $r$ ) of the variables to the two dimensions of the MFA on the variables factors map (g) for HFD-fed males.

#### 4. Discussion

We investigated the effects of a maternal obese environment and preconceptional WL on the evolution of selected metabolic measures over time, along with obesity-induced olfactory phenotypes in offspring. We found that:

1. The main effects on metabolic and olfactory phenotypes are linked to the post-weaning diet.
2. There is a noticeable influence of the maternal group: OB-HFD are more susceptible to develop obesity than CTRL-HFD males, OB-CD females are the best performing in the cookie test, fasting

does not improve the performance of WL-CD. In HFD-fed offspring, MFA reveals differences between OB and WL mice.

3. While maternal WL has positive effects on offspring metabolism, there is a programming effect of the preconceptional intervention on olfactory sensitivity.
4. Sex differences are observed: maternal obesity impairs male metabolism, and improves olfactory performances in female fed a CD. Odorant habituation is sensitive to the postweaning diet in female only.

To our knowledge, this is the first study addressing the respective role of preconceptional/perinatal and postweaning nutrients modulation on combined metabolic and olfactory outcomes, both known to contribute to food intake regulation, with a special focus on sex differences.

#### *4.1. Post-Weaning Diet Determined Metabolic and Olfactory Behavioural Risk in Mice*

As expected, HFD post weaning was a major contributor of both metabolic and olfactory disturbances. It indeed explains more than 45% of the variance in MFA, and was in line with other studies on metabolic outcomes of HFD [46]. Interestingly, HFD was associated with a low motivation and learning capacities to find a food reward after 5 weeks of diet only, yet sensitive to fasting in both sexes. However, later in adulthood, HFD-fed female mice even better performed in the habituation task, and no significant change in EOG response was noticed in males under HFD at sacrifice. The absence of long-term effect is quite unexpected regarding the effects in juvenile mice, but experiments were performed several months apart, based on different stimuli, sensitivities and neural pathways. Accordingly, a short-term effect of maternal obesity on juvenile male olfactory performances has been recently described, but was not associated to a modification of EOG response [18]. Other behavioural studies have reported variable long-term effects of genetic obesity [4,47,48] or diet [5,6,49] on olfactory performances in animals and humans [38,50,51]. Therefore, the deleterious impact of obesogenic context, either in the perinatal or post-weaning period, more likely derives from a modification in the central olfactory processing. We suggest that, rather than a long-term modification in the olfactory sensitivity, HFD might have influenced animal motivation to retrieve and consume the appetitive reward after few weeks of HFD. Indeed, diet-induced obesity induces a substantial decline in motivated behaviour, as for appetitive learning tasks [52,53] or responses to palatable rewards [54,55] as well as impairments in memory, attention or reward (for reviews, see [56,57]), some of these cognitive disorders being observed rapidly after diet change [18,58,59]. Finally, contrary to our hypothesis, we did not observe any long-term effect of an early HFD context on olfactory preference for familiar energy-rich pellets later, as published for food preferences [20,60]. Moreover, this was also observed recently for maternal high-protein diet, where only the F1 own diet influenced macronutrient self-selection [19].

This suggests that disturbance of olfactory sensitivity or cognitive function, or both, could develop along with metabolic imbalance in juvenile age in a maternal lipid-rich context, thus possibly fueling the vicious circle of appetite dysregulation and unhealthy food or nutrients choices [57]. Our findings thus favour a susceptibility to HFD exposure regarding offspring behavioural outcomes at adolescence, a period of neurobehavioural shaping preparing lifelong cognitive processing from the olfactory tract to the more central regions [61–63].

#### *4.2. Maternal Obesity Affects Male Offspring Weight and Male and Female Olfactory Behaviour*

We observed only a weak effect of maternal obesity on both metabolic and behavioural phenotypes. We previously reported that maternal obesity leads to an increased SGA phenotype at term of gestation [40]. Here, we report an increased risk for obesity in adult HFD-fed males born to OB mother. We also noticed that CD-fed females born to OB mothers better performed compared to those born to CTRL mothers in the hidden cookie test, suggesting that maternal obesity could improve olfactory and/or cognitive functions, providing that animals are on a healthy diet. As already discussed for HFD,

the maternal OB context might have influenced offspring neurocognitive performances by enhancing motivation for fat-rich reward [20,60,64,65].

From our previous results of increased SGA phenotype in this model [40] and from the literature [66–68], we expected stronger effects of maternal obesity. Several publications have recently pointed a small or inexistent impact of maternal obesity on offspring metabolic profile in mice [46,69,70]. There could rather be associations to some neurocognitive effects such as enhanced hedonic-like behaviours [64], not tested in our behavioural analysis. Other studies suggest the need for a mismatch of pre-pregnancy CD and gestational HFD to program glucose intolerance in offspring [71]. A recent meta-regression analysis concluded that maternal HFD exposure affects metabolic parameters in the offspring, but also underlined significant bias toward the non-publication of ‘negative’ results [72]. Finally, in our model, the modest survival of pups from OB mothers during the first week of life may have limited the expression of a maternally induced phenotype. The selected F1 survivors, less affected by maternal environment, may be less prone to develop metabolic or behavioural disturbances.

#### *4.3. Maternal Weight Loss Normalized Metabolic Parameters But Led to Impaired Olfactory Sensitivity*

We previously showed that preconceptional WL was beneficial to foetal growth, with a partial normalization in placental and hepatic gene expression patterns [40]. This suggests that maternal obesity, even when corrected before conception, leaves a “metabolic footprint”. In the present long-term study, maternal preconceptional WL normalized adult offspring weight and was not associated with any deleterious metabolic profile, but the MFA performed on all combined phenotypes showed a separation between WL and OB male offspring. Particularly, WL male offspring exhibited a lower peripheral olfactory sensitivity, and fasting did not improve motivation to retrieve cheese in WL mice under CD. As EOG were performed in males only, we cannot exclude possible altered mucosal sensitivity in females as well. As already reported in various rat and sheep models [33–36], the nutritional intervention did not entirely restore maternal preconceptional weight and female remained slightly heavier than controls. In the offspring, some phenotypes were not normalized at all, or were at an intermediate level between obese and control mothers.

The decrease in olfactory sensitivity in WL males and the resistance of WL-CD to fasting could stem from the preconceptional caloric depletion associated with the transition to CD in mothers or to a maternal stress linked to the procedure of food transition per se, through the rapid lost weight. Indeed growing evidence suggests that preconceptional adversity may affect the progeny even in adulthood [73]. Interestingly, a nutritional intervention could increase the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal axis response, independently from the mother’s metabolic status [35,74]. Female offspring born to moderate calorie-restricted mothers displayed increased vulnerability in the olfactory bulb and in regions involved in feeding control [17]. Therefore, maternal nutritional stress might have altered the neurocognitive development of the offspring. Besides, the low motivation of fasted WL-CD mice to find hidden cheese could illustrate the expression of an olfactory-guided behaviour in a non-normalized metabolic context. Indeed, while fasting improved smelling capacity in lean animals, obese animals usually remain insensitive to fasting [47,49,75]. Further studies are needed to discriminate the effect of energy depletion from the effect of stress on the maternal effects reported herein.

#### *4.4. Sex Differences in the Offspring Phenotype*

Our data pointed out a noticeable male-preferential impact in the body weight conditioning by maternal obesity, as it was previously reported [76]. Accordingly, the MFA analysis summarized this sex-specific outcome. Maternal effect on olfactory phenotypes was instead stronger in female: OB-CD were the best performing in the hidden cookie test and differed in habituation profile to pentanol according to post-weaning diet. Sex specificities occur in most NCDs, but it is recent that animal models in the DOHaD context do not only focus on male offspring. Disparity between males and females includes the timing of onset and severity of metabolic disease outcomes and neurobehavioural changes in response to maternal metabolism [17,77]. In the meta-analysis cited above, maternal

HFD was associated with increased body weight, adiposity, dyslipidaemia and insulinaemia in all mice but hyperglycaemia was restricted to females [72]. Moreover, some sex-divergent behavioural consequences of HFD have been attributed to a differential activation of the neuroendocrine system [78]. Female olfactory performances have not however been studied widely. To our knowledge, this is the first study that includes males and females in the same cohort.

## 5. Conclusions

In conclusion, we demonstrated that maternal preconceptional weight loss roughly normalized the survival and metabolic profile of the offspring, but induced a reduction in the sensitivity of the olfactory mucosa. Maternal weight loss was not associated to any other deleterious phenotype. It remains unclear whether the programming effect of maternal weight loss is due to maternal stress or nutrition per se.

In humans, preconceptional weight loss is obviously recommended to obese women, yet few studies have been conducted on the consequences for the offspring. We believe that more animal experiments and human cohorts are needed to clarify the beneficial effect of maternal preconceptional weight loss on the offspring's health.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/5/948/s1>, Methods S1: Food odour preference test. Figure S1: Food odour preference is not influenced by post-weaning diet but may be influenced by maternal group. Table S1: Body composition of mothers at sacrifice (1 week post-weaning) and offspring at sacrifice (6 months of age) after 6-h fasting.

**Author Contributions:** A.G., C.B. (Christine Baly) and C.J. conceived the project and acquire funding. P.E.P., M.J., M.-C.L. and A.G. designed the experiments. P.E.P., M.-C.L., M.J., M.L., S.S.-S., K.B., N.M., M.-A.P., D.D., C.B. (Christine Baly) and A.G. performed the experiments, sample collections and analysed the data. S.V. analysed the metabolic data and edited for English language. M.-C.L. and K.B. analysed the olfactory data. L.J. and D.R.-R. assisted with statistical analysis. C.B. (Christine Baly) and A.G. wrote the manuscript. H.J., S.L. and C.B. (Christophe Breton) contributed to the discussion and reviewed the manuscript. All authors approved the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work.

**Funding:** This study was financially supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), the Fondation Cœur et Artères (FCA 13T1) and the Institut Benjamin Delessert. P.E.P., S.V. and S.S.-S. were supported by the Ministère de la Recherche.

**Acknowledgments:** We thank the members of the Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons Unit (UE 0907) of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) of Jouy-en-Josas for their professionalism and help with animal experiments. We are grateful to Adrien Acquistapace, Alexandr V. Baklanov, Pierre Caillol, Amandine Catonné, Soahary Jean-René, Régine Monnerie, Audrey Prézélin and Aurélien Raynaud for their experimental help and to Aurélia Bruneau for sharing with us her expertise in OGTT experiments. We thank the Budget and Personnel management service of our research units.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Seidell, J.C.; Halberstadt, J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *ANM* **2015**, *66*, 7–12. [[CrossRef](#)]
- Reichelt, A.C.; Stoeckel, L.E.; Reagan, L.P.; Winstanley, C.A.; Page, K.A. Dietary influences on cognition. *Physiol. Behav.* **2018**, *192*, 118–126. [[CrossRef](#)]
- Islam, M.A.; Fagundo, A.B.; Arcelus, J.; Agüera, Z.; Jiménez-Murcia, S.; Fernández-Real, J.M.; Tinahones, F.J.; de la Torre, R.; Botella, C.; Frühbeck, G.; et al. Olfaction in eating disorders and abnormal eating behavior: A systematic review. *Front. Psychol.* **2015**, *6*, 1431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lacroix, M.-C.; Caillol, M.; Durieux, D.; Monnerie, R.; Grebert, D.; Pellerin, L.; Repond, C.; Tolle, V.; Zizzari, P.; Baly, C. Long-lasting metabolic imbalance related to obesity alters olfactory tissue homeostasis and impairs olfactory-driven behaviors. *Chem. Senses* **2015**, *40*, 537–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thiebaud, N.; Johnson, M.C.; Butler, J.L.; Bell, G.A.; Ferguson, K.L.; Fadool, A.R.; Fadool, J.C.; Gale, A.M.; Gale, D.S.; Fadool, D.A. Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 6970–6984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



6. Tucker, K.R.; Godbey, S.J.; Thiebaud, N.; Fadool, D.A. Olfactory ability and object memory in three mouse models of varying body weight, metabolic hormones, and adiposity. *Physiol. Behav.* **2012**, *107*, 424–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Palouzier-Paulignan, B.; Lacroix, M.-C.; Aimé, P.; Baly, C.; Caillol, M.; Congar, P.; Julliard, A.K.; Tucker, K.; Fadool, D.A. Olfaction under metabolic influences. *Chem. Senses* **2012**, *37*, 769–797. [[PubMed](#)]
8. Fernandez-Garcia, J.C.; Alcaide, J.; Santiago-Fernandez, C.; Roca-Rodriguez, M.M.; Aguera, Z.; Baños, R.; Botella, C.; de la Torre, R.; Fernandez-Real, J.M.; Fruhbeck, G.; et al. An increase in visceral fat is associated with a decrease in the taste and olfactory capacity. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171204.
9. Patel, Z.M.; DelGaudio, J.M.; Wise, S.K. Higher body mass index is associated with subjective olfactory dysfunction. *Behav. Neurol.* **2015**, *2015*, 675635. [[CrossRef](#)]
10. Simchen, U.; Koebnick, C.; Hoyer, S.; Issanchou, S.; Zunft, H.-J.F. Odour and taste sensitivity is associated with body weight and extent of misreporting of body weight. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2006**, *60*, 698–705. [[CrossRef](#)]
11. Barker, D.J. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* **1990**, *301*, 1111. [[CrossRef](#)]
12. Hanson, M.A.; Gluckman, P.D. Early developmental conditioning of later health and disease: Physiology or pathophysiology? *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 1027–1076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Portha, B.; Grandjean, V.; Movassat, J. Mother or father: Who is in the front line? Mechanisms underlying the non-genomic transmission of obesity/diabetes via the maternal or the paternal line. *Nutrients* **2019**, *11*, 233. [[CrossRef](#)]
14. Coppola, D.M.; Millar, L.C. Olfaction in utero: Behavioral studies of the mouse fetus. *Behav. Process.* **1997**, *39*, 53–68. [[CrossRef](#)]
15. Carreon, M.; Torrero, C.; Regalado, M.; Rubio, L.; Salas, M. Olfactory discrimination in adult male rats undernourished during the pre- and neonatal period. *J. Behav. Brain Sci.* **2012**, *2*, 283–290. [[CrossRef](#)]
16. Frias, C.; Torrero, C.; Regalado, M.; Salas, M. Development of mitral cells and olfactory bulb layers in neonatally undernourished rats. *Nutr. Neurosci.* **2009**, *12*, 96–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ramírez-López, M.T.; Vázquez, M.; Lomazzo, E.; Hofmann, C.; Blanco, R.N.; Alén, F.; Antón, M.; Decara, J.; Arco, R.; Orío, L.; et al. A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of rat offspring in a sex-specific manner. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0174307.
18. Merle, L.; Person, O.; Bonnet, P.; Grégoire, S.; Soubeyre, V.; Grosmaître, X.; Jarriault, D. Maternal high fat high sugar diet disrupts olfactory behavior but not mucosa sensitivity in the offspring. *Psychoneuroendocrinology* **2019**, *104*, 249–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Carlin, G.; Chaumontet, C.; Blachier, F.; Barbillon, P.; Darcel, N.; Blais, A.; Delteil, C.; Guillin, F.M.; Blat, S.; van der Beek, E.M.; et al. Maternal high-protein diet during pregnancy modifies rat offspring body weight and insulin signaling but not macronutrient preference in adulthood. *Nutrients* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)]
20. Brenseke, B.; Bahamonde, J.; Talanian, M.; Kornfeind, E.; Daly, J.; Cobb, G.; Zhang, J.; Prater, M.R.; Davis, G.C.; Good, D.J. Mitigating or exacerbating effects of maternal-fetal programming of female mice through the food choice environment. *Endocrinology* **2015**, *156*, 182–192. [[CrossRef](#)]
21. Mariona, F.G. Perspectives in obesity and pregnancy. *Womens Health (Lond.)* **2016**, *12*, 523–532. [[CrossRef](#)]
22. Catalano, P.; deMouzon, S.H. Maternal obesity and metabolic risk to the offspring: Why lifestyle interventions may have not achieved the desired outcomes. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 642–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hanson, M.; Barker, M.; Dodd, J.M.; Kumanyika, S.; Norris, S.; Steegers, E.; Stephenson, J.; Thangaratinam, S.; Yang, H. Interventions to prevent maternal obesity before conception, during pregnancy, and post partum. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2017**, *5*, 65–76. [[CrossRef](#)]
24. Van Oers, A.M.; Mutsaerts, M.A.Q.; Burggraaff, J.M.; Kuchenbecker, W.K.H.; Perquin, D.A.M.; Koks, C.A.M.; van Golde, R.; Kaaijk, E.M.; Broekmans, F.J.; de Bruin, J.P.; et al. Association between periconceptional weight loss and maternal and neonatal outcomes in obese infertile women. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kjaer, M.M.; Nilas, L. Pregnancy after bariatric surgery—A review of benefits and risks. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2013**, *92*, 264–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Smith, J.; Cianflone, K.; Biron, S.; Hould, F.S.; Lebel, S.; Marceau, S.; Lescelleur, O.; Biertho, L.; Simard, S.; Kral, J.G.; et al. Effects of maternal surgical weight loss in mothers on intergenerational transmission of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 4275–4283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Jain, A.P.; Gavard, J.A.; Rice, J.J.; Catanzaro, R.B.; Artal, R.; Hopkins, S.A. The impact of interpregnancy weight change on birthweight in obese women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2013**, *208*, 205. [[CrossRef](#)]
28. McBain, R.D.; Dekker, G.A.; Clifton, V.L.; Mol, B.W.; Grzeskowiak, L.E. Impact of inter-pregnancy BMI change on perinatal outcomes: A retrospective cohort study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2016**, *205*, 98–104. [[CrossRef](#)]
29. Diouf, I.; Charles, M.A.; Thiebaugeorges, O.; Forhan, A.; Kaminski, M.; Heude, B.; EDEN Mother-Child Cohort Study Group. Maternal weight change before pregnancy in relation to birthweight and risks of adverse pregnancy outcomes. *Eur. J. Epidemiol.* **2011**, *26*, 789–796. [[CrossRef](#)]
30. Oteng-Ntim, E.; Mononen, S.; Sawicki, O.; Seed, P.T.; Bick, D.; Poston, L. Interpregnancy weight change and adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **2018**, *8*, e018778. [[CrossRef](#)]
31. Forsum, E.; Brantsæter, A.L.; Olafsdottir, A.-S.; Olsen, S.F.; Thorsdottir, I. Weight loss before conception: A systematic literature review. *Food Nutr. Res.* **2013**, *57*. [[CrossRef](#)]
32. Matusiak, K.; Barrett, H.L.; Callaway, L.K.; Nitert, M.D. Periconception weight loss: Common sense for mothers, but what about for babies? *J. Obes.* **2014**, *2014*, 204295. [[CrossRef](#)]
33. Nathanielsz, P.W.; Ford, S.P.; Long, N.M.; Vega, C.C.; Reyes-Castro, L.A.; Zambrano, E. Interventions to prevent adverse fetal programming due to maternal obesity during pregnancy. *Nutr. Rev.* **2013**, *71*, S78–S87. [[CrossRef](#)]
34. Dennison, C.A.; Eslinger, A.J.; Reimer, R.A. Preconception probiotic and sitagliptin treatment in obese rats affects pregnancy outcomes and offspring microbiota, adiposity, and glycemia. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhang, S.; Rattanaray, L.; Morrison, J.L.; Nicholas, L.M.; Lie, S.; McMillen, I.C. Maternal obesity and the early origins of childhood obesity: Weighing up the benefits and costs of maternal weight loss in the periconceptional period for the offspring. *Exp. Diabetes Res.* **2011**, *2011*, 585749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Nicholas, L.M.; Morrison, J.L.; Rattanaray, L.; Ozanne, S.E.; Kleemann, D.O.; Walker, S.K.; MacLaughlin, S.M.; Zhang, S.; Martin-Gronert, M.S.; McMillen, I.C. Differential effects of exposure to maternal obesity or maternal weight loss during the periconceptional period in the sheep on insulin signalling molecules in skeletal muscle of the offspring at 4 months of age. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84594.
37. Holinski, F.; Menenakos, C.; Haber, G.; Olze, H.; Ordemann, J. Olfactory and gustatory function after bariatric surgery. *Obes. Surg.* **2015**, *25*, 2314–2320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Richardson, B.E.; Vanderwoude, E.A.; Sudan, R.; Leopold, D.A.; Thompson, J.S. Gastric bypass does not influence olfactory function in obese patients. *Obes. Surg.* **2012**, *22*, 283–286. [[CrossRef](#)]
39. Zerrweck, C.; Gallardo, V.C.; Calleja, C.; Sepúlveda, E.; Guilber, L. Gross olfaction before and after laparoscopic gastric bypass. *Obes. Surg.* **2017**, *27*, 2988–2992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Panchenko, P.E.; Voisin, S.; Jouin, M.; Jouneau, L.; Prézélin, A.; Lecoutre, S.; Breton, C.; Jammes, H.; Junien, C.; Gabory, A. Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth in mice. *Clin. Epigenetics* **2016**, *8*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Gallou-Kabani, C.; Vigé, A.; Gross, M.-S.; Boileau, C.; Rabes, J.-P.; Fruchart-Najib, J.; Jais, J.-P.; Junien, C. Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *292*, E1095–E1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mandairon, N.; Sultan, S.; Rey, N.; Kermen, F.; Moreno, M.; Busto, G.; Farget, V.; Messaoudi, B.; Thevenet, M.; Didier, A. A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice. *J. Neurosci. Methods* **2009**, *180*, 296–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lacroix, M.-C.; Badonnel, K.; Meunier, N.; Tan, F.; Schlegel-Le Poupon, C.; Durieux, D.; Monnerie, R.; Baly, C.; Congar, P.; Salesse, R.; et al. Expression of insulin system in the olfactory epithelium: First approaches to its role and regulation. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 1176–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Noguchi, K.; Gel, Y.; Brunner, E.; Konietschke, F. nparLD: An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J. Stat. Softw.* **2012**, *50*, 1–23. [[CrossRef](#)]
45. Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* **2008**, *25*, 1–18. [[CrossRef](#)]
46. King, V.; Norman, J.E.; Seckl, J.R.; Drake, A.J. Post-weaning diet determines metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2014**, *12*, 73. [[CrossRef](#)]

47. Aimé, P.; Palouzier-Paulignan, B.; Salem, R.; Al Koborssy, D.; Garcia, S.; Duchamp, C.; Romestaing, C.; Julliard, A.K. Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats. *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, *8*, 326.
48. Getchell, T.V.; Kwong, K.; Saunders, C.P.; Stromberg, A.J.; Getchell, M.L. Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol. Behav.* **2006**, *87*, 848–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Badonnel, K.; Lacroix, M.-C.; Durieux, D.; Monnerie, R.; Caillol, M.; Baly, C. Rat strains with different metabolic statuses differ in food olfactory-driven behavior. *Behav. Brain Res.* **2014**, *270*, 228–239. [[CrossRef](#)]
50. Obrebowski, A.; Obrebowska-Karsznia, Z.; Gawliński, M. Smell and taste in children with simple obesity. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2000**, *55*, 191–196. [[CrossRef](#)]
51. Stafford, L.D.; Whittle, A. Obese individuals have higher preference and sensitivity to odor of chocolate. *Chem. Senses* **2015**, *40*, 279–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Harb, M.R.; Almeida, O.F.X. Altered motivation masks appetitive learning potential of obese mice. *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, *8*, 377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Rossi, H.L.; Luu, A.K.S.; Kothari, S.D.; Kuburas, A.; Neubert, J.K.; Caudle, R.M.; Reiber, A. Effects of diet-induced obesity on motivation and pain behavior in an operant assay. *Neuroscience* **2013**, *235*, 87–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Finger, B.C.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Diet-induced obesity blunts the behavioural effects of ghrelin: Studies in a mouse-progressive ratio task. *Psychopharmacology* **2012**, *220*, 173–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Shin, A.C.; Berthoud, H.-R. Food reward functions as affected by obesity and bariatric surgery. *Int. J. Obes. (Lond.)* **2011**, *35*, S40–S44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Cordner, Z.A.; Tamashiro, K.L.K. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol. Behav.* **2015**, *152*, 363–371.
57. Martin, A.A.; Davidson, T.L. Human cognitive function and the obesogenic environment. *Physiol. Behav.* **2014**, *136*, 185–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Murray, A.J.; Knight, N.S.; Cochlin, L.E.; McAleese, S.; Deacon, R.M.J.; Rawlins, J.N.P.; Clarke, K. Deterioration of physical performance and cognitive function in rats with short-term high-fat feeding. *FASEB J.* **2009**, *23*, 4353–4360. [[CrossRef](#)]
59. Del Rio, D.; Morales, L.; Ruiz-Gayo, M.; Del Olmo, N. Effect of high-fat diets on mood and learning performance in adolescent mice. *Behav. Brain Res.* **2016**, *311*, 167–172. [[CrossRef](#)]
60. Dias-Rocha, C.P.; Almeida, M.M.; Santana, E.M.; Costa, J.C.B.; Franco, J.G.; Pazos-Moura, C.C.; Trevenzoli, I.H. Maternal high-fat diet induces sex-specific endocannabinoid system changes in newborn rats and programs adiposity, energy expenditure and food preference in adulthood. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *51*, 56–68. [[CrossRef](#)]
61. Boitard, C.; Etchamendy, N.; Sauvart, J.; Aubert, A.; Tronel, S.; Marighetto, A.; Layé, S.; Ferreira, G. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* **2012**, *22*, 2095–2100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Valladolid-Acebes, I.; Fole, A.; Martín, M.; Morales, L.; Cano, M.V.; Ruiz-Gayo, M.; Del Olmo, N. Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice. Is there a role of leptin? *Neurobiol. Learn. Mem.* **2013**, *106*, 18–25. [[PubMed](#)]
63. Murofushi, W.; Mori, K.; Murata, K.; Yamaguchi, M. Functional development of olfactory tubercle domains during weaning period in mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Peleg-Raibstein, D.; Sarker, G.; Litwan, K.; Krämer, S.D.; Ametamey, S.M.; Schibli, R.; Wolfrum, C. Enhanced sensitivity to drugs of abuse and palatable foods following maternal overnutrition. *Transl. Psychiatry* **2016**, *6*, e911. [[CrossRef](#)]
65. Wiss, D.A.; Criscitelli, K.; Gold, M.; Avena, N. Preclinical evidence for the addiction potential of highly palatable foods: Current developments related to maternal influence. *Appetite* **2017**, *115*, 19–27. [[CrossRef](#)]
66. Li, M.; Sloboda, D.M.; Vickers, M.H. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: Evidence from animal models. *Exp. Diabetes Res.* **2011**, *2011*, 592408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Williams, L.; Seki, Y.; Vuguin, P.M.; Charron, M.J. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 507–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Wankhade, U.D.; Zhong, Y.; Kang, P.; Alfaro, M.; Chintapalli, S.V.; Thakali, K.M.; Shankar, K. Enhanced offspring predisposition to steatohepatitis with maternal high-fat diet is associated with epigenetic and microbiome alterations. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



69. King, V.; Hibbert, N.; Seckl, J.R.; Norman, J.E.; Drake, A.J. The effects of an obesogenic diet during pregnancy on fetal growth and placental gene expression are gestation dependent. *Placenta* **2013**, *34*, 1087–1090. [[CrossRef](#)]
70. Platt, K.M.; Charnigo, R.J.; Pearson, K.J. Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2014**, *5*, 229–239. [[CrossRef](#)]
71. Sasson, I.E.; Vitins, A.P.; Mainigi, M.A.; Moley, K.H.; Simmons, R.A. Pre-gestational vs. gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice. *Diabetologia* **2015**, *58*, 615–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ribaroff, G.A.; Wastnedge, E.; Drake, A.J.; Sharpe, R.M.; Chambers, T.J.G. Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: A meta-regression analysis. *Obes. Rev.* **2017**, *18*, 673–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Taouk, L.; Schulkin, J. Transgenerational transmission of pregestational and prenatal experience: Maternal adversity, enrichment, and underlying epigenetic and environmental mechanisms. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2016**, *7*, 588–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zhang, S.; Morrison, J.L.; Gill, A.; Rattanatrav, L.; MacLaughlin, S.M.; Kleemann, D.; Walker, S.K.; McMillen, I.C. Maternal dietary restriction during the periconceptual period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and down-regulation of the IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. *Endocrinology* **2013**, *154*, 4650–4662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ferry, B. The orexinergic system influences conditioned odor aversion learning in the rat: A theory on the processes and hypothesis on the circuit involved. *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, *8*, 164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wankhade, U.D.; Zhong, Y.; Kang, P.; Alfaro, M.; Chintapalli, S.V.; Piccolo, B.D.; Mercer, K.E.; Andres, A.; Thakali, K.M.; Shankar, K. Maternal high-fat diet programs offspring liver steatosis in a sexually dimorphic manner in association with changes in gut microbial ecology in mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Dearden, L.; Bouret, S.G.; Ozanne, S.E. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Mol. Metab.* **2018**, *15*, 8–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Boukouvalas, G.; Antoniou, K.; Papalexi, E.; Kitraki, E. Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. *Neuroscience* **2008**, *153*, 373–382. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## **2) Effet des trajectoires pondérales maternelles sur le profil métabolique du foie et du cerveau, révélé par une approche métabolomique non-dirigée, chez la souris**

*Effect of maternal ponderal trajectories on metabolic profiles in liver and brain revealed by non-targeted metabolomics approach in mice*

### **2.1) Contexte**

En 2015, la prévalence de l'obésité chez la femme était de 15% (OMS, 2016). L'obésité est un facteur de risque de complications métaboliques et obstétricales au cours de la grossesse (C. Y. W. Lee et Koren 2010). Chez l'être humain, l'obésité maternelle est associée à un poids fœtal élevé pour l'âge gestationnel ou, au contraire, à une restriction de la croissance fœtale (Rajasingam et al. 2009; Gaudet et al. 2014; Acosta et al. 2015). L'obésité peut avoir un impact sur l'organogenèse du fœtus, avec des conséquences sur la fonction des organes après la naissance (Williams et al. 2014).

Compte tenu des nombreux risques, à la fois pour la mère et son enfant, il est recommandé aux femmes en surcharge pondérale de perdre du poids avant la conception (Haute Autorité de Santé 2011). Cependant, les conséquences d'une perte de poids, induite par une intervention nutritionnelle chez les sujets obèses, sur le développement fœtal et par extension, sur les tissus participant au contrôle de l'homéostasie énergétique et du comportement alimentaire sont peu connues, de même que les effets qu'elle pourrait avoir à long terme (Forsum et al. 2013). Une variation des apports énergétiques au cours des périodes clés de la gamétogenèse et du développement pourraient altérer la mise en place d'organes clés de la régulation du métabolisme énergétique et des comportements alimentaires, avec, également, des conséquences à long terme pour la santé (Williams et al. 2014; Dearden et Ozanne 2015).

La morphologie et la fonction du foie, organe qui contrôle l'homéostasie métabolique, sont altérées *in utero* par l'obésité et/ou la surnutrition hyperlipidique de la mère (McCurdy et al. 2009; Plata et al. 2014). Ces altérations hépatiques sont associées au développement d'une stéatose hépatique non-alcoolique à l'âge adulte (McCurdy et al. 2009). La morphologie et les fonctions de l'hypothalamus, structure cérébrale impliquée dans le contrôle de l'homéostasie

énergétique et les comportements alimentaires, sont aussi altérées par l'obésité et/ou le régime HFD maternel (Chang et al. 2008; Sanders et al. 2014). Ces altérations hypothalamiques peuvent persister jusqu'à l'âge adulte et sont associées à une modification des comportements alimentaires et hédoniques (Vogt et al. 2014; D Peleg-Raibstein et al. 2016). Enfin, la fonction du bulbe olfactif, structure cérébrale impliquée dans le traitement et la modulation de la réponse aux odeurs, peut, elle aussi, être altérée par la nutrition hyperlipidique maternelle à court et long terme (Merle et al. 2019; Panchenko et al. 2016).

Afin d'identifier les mécanismes associés à ces variations fonctionnelles, les études portent souvent sur un métabolite ou un groupe de métabolites, ce qui est pertinent mais réducteur. En effet, le métabolisme implique de multiples voies et une analyse holistique peut être judicieuse dans le contexte de la DOHaD pour découvrir de nouvelles voies métaboliques chez la descendance associées au métabolisme maternel (Hivert et al. 2015). La métabolomique non-dirigée est donc une méthodologie de choix. En effet, cette méthode holistique permet d'avoir une image globale des métabolites d'un tissu, permettant ainsi une analyse exploratoire, contrairement aux études dirigées qui s'intéressent à des métabolites spécifiques.

Chez l'être humain, peu d'articles présentent les résultats d'études métabolomiques dans le contexte de la DOHaD. Elles sont généralement centrées sur l'étude du plasma maternel et des descendants, du sang de cordon ou du placenta, en absence de toute intervention nutritionnelle chez les mères obèses (Rauschert et al. 2017), et rarement consacrées à la comparaison de plusieurs compartiments biologiques. Chez l'animal, quatre études métabolomiques ont été réalisées dans le contexte de la DOHaD, plus particulièrement en condition de restriction protéique (Preidis et al. 2014; Agnoux et al. 2014; Sato et al. 2017; Pedroso et al. 2017; 2018), l'étude d'Agnoux étant réalisée sur plusieurs compartiments métaboliques. Une seule étude de la littérature, chez le macaque, présente les effets d'une intervention nutritionnelle préconceptionnelle (retour à un régime contrôle) en contexte d'obésité maternelle sur les métabolites du foie fœtal (Wesolowski et al. 2018). Quant aux analyses métabolomiques sur le cerveau, elles sont peu nombreuses pour des questions de limites méthodologiques (Gonzalez-Riano, Garcia, et Barbas 2016), mais prometteuses pour identifier des voies impactées par une alimentation déséquilibrée (Rutkowsky et al. 2018). A notre connaissance, elles ne pas encore développées dans le cadre de la DOHaD. Les effets à long terme des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles sur le phénotype métabolique du foie et des tissus nerveux restent donc à évaluer.

Sur la base des résultats du modèle TPMP, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle l'obésité maternelle pourrait avoir un impact négatif sur le phénotype métabolique du foie, de l'hypothalamus et du bulbe olfactif des descendants F1. Le but était de voir si la perte de poids maternelle préconceptionnelle, induite par une intervention nutritionnelle, pouvait corriger les effets induits par le contexte obésogène maternel, par quelle(s) voie(s) métaboliques, et selon quel contexte post-sevrage.

Afin d'avoir une image globale des voies métaboliques de ces tissus, nous avons choisi de les analyser de manière non-dirigée en chromatographie liquide suivie d'une détection par spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS, pour *liquid chromatography – high resolution mass spectrometry*). La LC-HRMS permet aussi d'évaluer les différences d'abondance des métabolites entre les différents groupes de régimes, dans chaque tissu, de manière précise grâce à la haute résolution.

Nos travaux antérieurs montraient que l'obésité maternelle préconceptionnelle était associée à une aggravation de l'obésité des descendants mâles sous régime HFD tandis que la perte de poids préconceptionnelle était associée à une diminution de la sensibilité olfactive des mâles F1 à l'âge adulte, indépendamment de leur régime post-sevrage (Panchenko et al. 2019). Pour ces raisons, nous avons sélectionné les 6 individus mâles les plus représentatifs (médians) de leur groupe de régime maternel et post-sevrage en se basant sur une analyse en composante principale, en excluant les individus qui présentaient des lésions macroscopiques observées lors des prélèvements sur au moins l'un des tissus d'intérêt. Les tissus ont été prélevés sur les souris à 6 mois, après le sacrifice, puis conservés à -80°C jusqu'à leur envoi à l'entreprise Profilomic. Cette entreprise a réalisé la préparation des échantillons, les analyses par LC-HRMS et procédé à l'annotation putative des métabolites en se basant sur leur base de données interne de composés chimiques purs. Nous avons ensuite réalisé les analyses bio-statistiques et bio-informatiques sur le logiciel Workflow4Metabolomics, sous la supervision d'Etienne Thévenot (CEA Saclay, Digiteo, MetaboHub) et grâce à la formation Workflow4Experimenters que j'ai suivie en 2018 (<https://workflow4metabolomics.org/W4E2018>). Grâce à ces analyses, nous avons pu identifier les métabolites dont l'abondance était impactée par le groupe maternel ou le régime post-sevrage, ainsi que l'interaction entre les deux et évaluer les voies métaboliques impliquées à l'aide du logiciel MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

## 2.2) Méthodes

### 2.2.1) Analyses statistiques

Les données, issues de l'étude métabolomique par LC-HRMS réalisée par Profilomic, ont été importées dans l'outil d'analyse en ligne sous environnement Galaxy, Workflow4Metabolomics (W4M). Une étape préalable aux analyses statistiques de ces données a été la vérification de leur qualité, à l'aide de l'outil « quality metrics » proposé par W4M. A l'issue de cette vérification, les individus présentant des données aberrantes (*outliers*) ont été exclus de la suite des analyses : pour le foie, un CTRL-HFD et un WL-CD, pour l'hypothalamus, un WL-CD et pour le bulbe olfactif, un WL-HFD. Chaque tissu a été analysé séparément.

#### Analyses descriptives

Les analyses descriptives ont été réalisées en utilisant la méthode d'analyse discriminante des moindres carrés partiels, ou PLS-DA (pour *partial least squares – discriminant analysis*). Ce type d'analyse permet de construire un modèle à partir de données et de tester la robustesse de ce modèle. La PLS-DA permet d'identifier les métabolites les plus représentatifs du modèle ainsi que ceux contribuant le plus aux différences entre les groupes d'individus en leur attribuant un score VIP (pour *variable influence on projection*). Ce type de score est particulièrement intéressant dans une optique de recherche de biomarqueurs, mais ce n'était pas l'objet primaire de notre étude. De plus, ce type d'analyse ne nous permet pas de révéler les effets du groupe maternel, du régime post-sevrage ou de l'interaction entre les deux. Seule une analyse différentielle nous permet d'obtenir ces informations.

#### Analyses différentielles

Le seul test statistique différentiel permettant de tester les effets du groupe maternel d'une part et du régime propre aux individus d'autre part, ainsi que les interactions entre ces différents effets, est l'ANOVA à deux facteurs (2-ways ANOVA). Pour les métabolites dont l'abondance détectée différait en fonction du groupe maternel ou présentait une interaction entre le groupe maternel et le régime post-sevrage, un test post-hoc par la méthode de Tukey a été réalisé en utilisant le package LS-Means du logiciel R.

## 2.2.2) Analyses bio-informatiques

Le but de ces analyses bio-informatique était d'identifier les voies métaboliques les plus représentées dans notre jeu de données et d'identifier les voies métaboliques impactées par le régime des descendants.

### Constitution des tables d'analyse des métabolites

La première étape, indispensable pour constituer un jeu de données qui puisse être analysée ensuite par différents outils, a été la vérification manuelle de l'identifiant associé à chaque métabolite, en se basant sur le nom du métabolite, sa formule chimique, son identifiant HMDB (pour *The Human Metabolome Database*, <http://www.hmdb.ca/>, qui est une base de données de métabolites présents chez l'être humain), son identifiant ChEbi (pour *Chemical Entities of Biological Interest*, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/>, qui est une base de données d'entités moléculaires axée sur les «petits» composés chimiques). Pour cela nous avons exploré plusieurs bases de données : ChEbi, KEGG, HMDB, PubChem, ChemSpider. Cependant, dans notre jeu de données initial, certains métabolites n'avaient pas de numéro d'identification associé à la base de données HMDB ou KEGG : 7 dans le foie, 3 dans l'hypothalamus et 4 dans le bulbe olfactif.

### Test des différents outils bio-informatiques disponibles

Les trois outils d'analyse les plus fréquemment utilisés dans le cadre d'études métabolomiques ont été testés :

- **KEGG** (pour *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) est une base de données visant à comprendre les fonctions et l'organisation des systèmes biologiques, à partir d'informations moléculaires, en particulier de jeux de données à grande échelle générés par le séquençage du génome et d'autres analyses à haut débit comme la métabolomique. Dans nos jeux de données, une partie des métabolites n'avait pas d'identifiant KEGG. De plus, peu d'outils adaptés aux analyses bio-informatiques de données de métabolomique sont actuellement disponibles sur cette interface.

- **MetExplore** propose une solution en ligne composée d'outils interactifs pour l'analyse et l'exploration de réseaux métaboliques. En particulier, il comprend un module puissant de visualisation des réseaux. Cet outil s'est révélé peu adapté à nos jeux de données. En effet, une grande partie des identifiants des métabolites détectés dans nos tissus ne sont pas

reconnus et il était impossible d'importer la moitié des métabolites présentant une abondance différentielle entre régime post-sevrage des descendants.

- **MetaboAnalyst** est une interface d'analyse statistique, fonctionnelle et intégrative de données métabolomiques. Dans cet outil, les identifiants utilisés sont ceux de la base de données HMDB, qui sont ensuite convertis en identifiants KEGG. Aussi, seule une faible proportion de métabolites de nos jeux de données n'était pas reconnue. Dans le set initial, nous en avons : 25/214 dans le foie, 14/155 dans l'hypothalamus et 32/197 dans le bulbe olfactif, parmi les métabolites impactés par le régime HFD : 12/88 dans le foie, 3/12 dans l'hypothalamus et 1/10 dans le bulbe olfactif. De plus, cet outil permettait de faire des analyses d'enrichissement de type MSEA (*metabolite set enrichment analysis*), soit de manière qualitative (analyse de surreprésentation ou ORA pour *over representation analysis*) soit de manière quantitative (analyse quantitative d'enrichissement ou QEA pour *quantitative enrichment analysis*). Il était aussi possible de réaliser des analyses permettant l'identification des voies métaboliques impactées (analyses de *pathways*) en utilisant les bases de données SMPDB (pour *Small Molecule Pathway Database*, <http://smpdb.ca/>) ou KEGG. Quelle que soit la base de données utilisée, l'étape finale de l'analyse (topographie des voies métaboliques) utilisait la base de données de voies métaboliques KEGG.

Compte-tenu des éléments présentés ici, il a été décidé de procéder aux analyses bio-informatiques en utilisant l'outil d'analyse MetaboAnalyst et en réalisant deux types d'analyses : des analyses d'enrichissement MSEA-ORA et MSEA-QEA en utilisant la base de données SMPDB, ainsi que des analyses de voies métaboliques ou *pathways*, en utilisant la base de données KEGG.

### **2.2.3) Protocole d'analyse des données issues d'étude métabolomique**

Le protocole d'analyse à partir des données brutes, jusqu'à l'annotation putative des métabolites, est issu de la formation Workflow4Experimenters, de MetaboHUB et est présenté en annexe (**Protocole I**).

En annexe se trouve aussi le protocole d'analyse que nous avons utilisé en partant des données produites par Profilomic, jusqu'à l'identification des voies métaboliques différenciellement impactées par le régime post-sevrage des descendants (**Protocole II**).

### 2.3) Résultats et conclusions

Les résultats de l'analyse métabolomique sont inclus dans l'article : « Effect of maternal ponderal trajectories on metabolic profiles in liver and brain revealed by non-targeted metabolomics approach in mice » ci-joint en 2.4).

Par LC-HRMS, nous avons détecté 640 signaux dans le foie, correspondant à 278 métabolites. Dans l'hypothalamus, nous avons détecté 398 signaux, correspondant à 200 métabolites. Enfin, dans le bulbe olfactif, nous avons détecté 394 signaux, correspondant à 258 métabolites.

Un comptage manuel des classes de métabolites a mis en évidence les similarités entre les trois tissus, en particulier, une abondance élevée en acides aminés et peptides, en lipides, en nucléotides et nucléosides et en glucides (**Figure 2 de l'article**). Les analyses MSEA-ORA ont été réalisées dans chacun des tissus en comparant le jeu de données produit par Profilomic à leur base de données. Ces analyses ont mis en évidence une absence d'enrichissement dans les trois tissus.

Nous avons ensuite réalisé des analyses descriptives de nos données afin d'obtenir une représentation globale de l'impact du groupe maternel et du régime post-sevrage. L'analyse PLS-DA a permis la construction de modèles robustes selon le régime post-sevrage sur le profil métabolique du foie et de l'hypothalamus, mais aucun modèle n'a pu être construit pour le bulbe olfactif. Par ailleurs, aucun modèle n'a pu être construit selon le statut métabolique maternel sur le profil métabolique quel que soit le tissu étudié. Ainsi, l'analyse métabolomique a révélé un effet majeur du régime propre de l'individu dans le foie et l'hypothalamus (**Figure 3 de l'article**), confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus sur l'analyse phénotypique (Panchenko et al. 2019).

Nous avons ensuite recherché les métabolites qui présentaient des différences d'abondance selon le régime post-sevrage, le groupe maternel ou une interaction entre ces facteurs. Pour cela, nous avons réalisé des analyses différentielles par ANOVA à 2 facteurs. A nouveau, nous avons observé un impact majeur du régime post-sevrage dans le foie, avec 108 métabolites différentiellement abondants (CD vs. HDF), soit plus d'un tiers des métabolites détectés dans le foie. L'abondance était augmentée pour 55 de ces métabolites et diminuée pour 53 d'entre eux. Le régime post sevrage a aussi eu un effet sur l'abondance de 16 métabolites dans l'hypothalamus et de 11 métabolites dans le bulbe olfactif, représentant respectivement 8% et 4% des métabolites détectés dans ces tissus (**Figure 4 de l'article**).



De manière intéressante, parmi les métabolites impactés par le régime post-sevrage, trois étaient communs aux trois tissus : l'anhydroglucitol, l'hydroxybutyrate et la saccharopine (**Figure 4 de l'article**). De plus, le sens de variation et l'amplitude d'effet du régime HFD sur l'abondance de chacun de ces métabolites étaient similaire dans chaque tissu (**Figure 4 de l'article**), avec une diminution de l'anhydrosorbitol et de la saccharopine et une augmentation de l'hydroxybutyrate chez les animaux HFD.

De manière intéressante, dans le foie, nous avons également mis en évidence une interaction entre le groupe maternel et le régime post-sevrage qui s'est matérialisée sur l'abondance d'un **pentose ou hexose-phosphate**, dont l'annotation n'a pu être précisée en MS/MS. Dans le groupe CTRL, le régime HFD entraînait une diminution de son abondance, tandis que dans le groupe OB, nous avons observé une augmentation suite au régime HFD. En revanche, dans le groupe WL, le régime HFD n'a pas eu d'effet sur l'abondance de ce métabolite (**Figure 5b de l'article**). Plus intéressant encore, toujours dans le foie, indépendamment du régime post-sevrage, l'obésité maternelle était associée à la diminution d'un métabolite, l'**ansérine**, tandis que la perte de poids maternelle préconceptionnelle normalisait son abondance (**Figure 5a de l'article**). Les résultats détaillés des analyses différentielles réalisées dans chaque tissu sont présentés en **Annexe 3, 4, et 5 (Tableaux I, II et III)**.

Les analyses MSEA-QEA ont révélé un enrichissement en métabolites associés à différentes voies métaboliques en fonction des tissus, les résultats sont présentés en annexe :

- Dans le **foie**, les métabolites étaient associés à un enrichissement du métabolisme des lipides, des phospholipides, des triglycérides et des acides gras, des glucides, des acides aminés, mais aussi du métabolisme des acides biliaires, du métabolisme mitochondrial ainsi que du métabolisme des vitamines B et de certaines hormones (**Tableau IV**).
- Dans l'**hypothalamus**, les métabolites étaient associés à un enrichissement de la voie de biosynthèse du pantothénate (vitamine B5) et de la coenzyme A, du métabolisme de la  $\beta$ -alanine, de la phénylalanine et de la tyrosine, du cycle de l'urée, de la biosynthèse de la spermidine et de la spermine, du métabolisme de l'aspartate, de la dégradation de la lysine, du métabolisme de l'aspartate, de la dégradation de la lysine, du métabolisme du propanoate, de la dégradation de la valine, la leucine et l'isoleucine, de la synthèse des hormones thyroïdiennes et du métabolisme de l'arginine et de la proline (**Tableau V**).
- Dans le **bulbe olfactif**, les métabolites étaient associés à un enrichissement du métabolisme de l'acide linoléique (oméga-6) et  $\alpha$ -linoléique (oméga-3) (**Tableau VI**).

Les analyses de *pathways* ou voies métaboliques ont été réalisées en retirant l'ADP de la liste des métabolites impactés par le régime HFD en raison de sa place centrale dans une multitude de voies métaboliques et réactions enzymatiques. De plus, l'utilisation de la base de données SMPDB, pour les analyses de *pathways* dans le foie, comportait des erreurs, tel que la présence d'enzymes dans la liste des métabolites de notre jeu de données. Nous avons donc choisi, pour le foie, d'utiliser uniquement les analyses de *pathways* réalisées à l'aide de la base de données KEGG. Ces analyses ont permis de révéler, dans le foie, un impact très important (Score d'impact >40%) du régime post-sevrage sur le métabolisme de la glutamine et du glutamate, la biosynthèse de l'ubiquinone et autres terpénoïdes-quinone, le métabolisme de la taurine et de l'hypotaurine, de la  $\beta$ -alanine et du méthane. De manière moins importante (Score d'impact compris entre 10 et 40%), le régime post-sevrage de la descendance a eu un impact sur le métabolisme des acides aminés, des lipides, des glucides et de la vitamine B. La liste complète des *pathways* est fournie dans le **Tableau 1** de l'article. Dans l'hypothalamus, le régime post-sevrage des descendants a eu un impact important sur le métabolisme de l'aspartate, de l'arginine et de la proline, le cycle de l'urée et sur le métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine. De plus, il a eu un effet, bien que moindre, sur la biosynthèse du pantothénate et de la coenzyme A, sur le recyclage de l'ammoniac ainsi que sur la dégradation de la lysine. Ces résultats sont les même quel que soit la base de données utilisée (**Tableau 2 de l'article**). Enfin, dans le bulbe olfactif, en utilisant la base de données SMPDB, le régime post-sevrage des descendants a eu un impact important sur le métabolisme de l'acide linoléique et  $\alpha$ -linoléique. En utilisant la base de données KEGG, le régime post-sevrage des descendants a eu un impact sur le métabolisme de l'arginine et de la proline, sur la biosynthèse du pantothénate et de la coenzyme A ainsi que sur la dégradation de la lysine (**Tableau 2 de l'article**).

La MSEA-QEA n'apporte que peu d'informations supplémentaires aux analyses de *pathways*, qui donnent déjà des résultats satisfaisants et permettent une bonne interprétation de nos données. Ces 2 analyses étant redondantes, nous avons choisi de présenter uniquement les analyses de *pathways* dans l'article.

En résumé, ce qu'il faut retenir des résultats des analyses métabolomiques est :

- un effet majeur du régime post-sevrage qui touche principalement le foie, mais qui affecte aussi l'hypothalamus et le bulbe olfactif.
- un impact du régime HFD post-sevrage sur 3 métabolites communs aux 3 tissus étudiés : l'anhydroglucitol, la saccharopine et le  $\beta$ -hydroxybutyrate.

- un effet persistant du groupe maternel dans le foie concernant 2 métabolites : un pentose ou hexose-phosphate et l'ansérine.

L'ensemble de ces résultats est discuté dans la 1<sup>ère</sup> partie de la partie Discussion de ce manuscrit de thèse.

## **2.4) Article**

## **Mouse liver and brain metabolomic response to high fat diet and maternal ponderal trajectories**

Sofiane Safi-Stibler, Etienne A. Thévenot, Luc Jouneau, Mélanie Jouin, Alexandre Seyer, Hélène Jammes, Delphine Rousseau-Ralliard, Christine Baly and Anne Gabory, to be submitted to Nature metabolism

### **Abstract**

Altered nutrition during developmental windows is particularly of high concern in offspring metabolic disease, with emerging questions about the role of the maternal weight trajectories before conception, particularly after weight loss. Insight in underlying physiological pathways in the offspring is pivotal, but poorly understood, and a broad overview is lacking in adults to identify affected pathways. How the maternal metabolic status impacts the offspring's metabolome was examined in three tissues involved in energy homeostasis control, liver, hypothalamus and olfactory bulb of adult male mice born to control, obese or weight loss mothers and fed either a control or high fat diet after weaning. Here we show that post-weaning diet interferes with the production of several metabolites in the three tissues, anhydroglucitol, saccharopine and hydroxybutyrate being common. Moreover, the maternal diet has a unique impact on the production of two metabolites, a pentose- or hexose-phosphate and anserine in the liver.

## 1 **Introduction**

2 In 2015, the worldwide prevalence of obesity in child-bearing age women was 15%<sup>1</sup>. Maternal obesity is a  
3 risk factor for metabolic and obstetrical complications during pregnancy<sup>2</sup>, but also for foetuses, since it is  
4 associated with a higher risk of either large for gestational age foetuses or, on the contrary, foetal growth  
5 restriction<sup>3-5</sup>. Consistently with the concept of the developmental origins of health and disease (DOHaD),  
6 obesity impacts on foetal organogenesis, altering organs functions after birth<sup>6</sup>.

7 Given the many risks for both mother and children, overweight women are advised to lose weight before  
8 conception<sup>7</sup>. However, the consequences of weight loss, in response to a nutritional intervention, on foetal  
9 and tissues development are poorly known, as well as their long-term effects<sup>8</sup>. Since foetal tissues adapt to  
10 the nutritional gestational environment, any variation in energy intake during key periods of gametogenesis  
11 and development alters the establishment of key organs regulating energy metabolism and eating behaviours,  
12 with long-term consequences<sup>6,9</sup>. The morphology and functions of the liver, which controls metabolic  
13 homeostasis, are altered *in utero* in the context of maternal obesity and / or high fat diet (HFD)<sup>10,11</sup>. These  
14 liver changes are associated with the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in  
15 adulthood<sup>10</sup>. The morphology and functions of the hypothalamus, a brain structure involved in the control of  
16 energy homeostasis and eating behaviours, are also altered by obesity and / or maternal HFD<sup>12,13</sup>. These  
17 hypothalamic alterations are associated in the adulthood with changes in dietary and hedonic behaviours<sup>14-16</sup>.  
18 Finally, the function of the olfactory system which participates to the food intake control can also be altered  
19 by maternal HFD<sup>17,18</sup>.

20 We developed a mouse animal model of preconceptional maternal obesity and weight loss. At short term,  
21 maternal obesity led to small-for-gestational age foetuses that was normalized with preconceptional maternal  
22 weight loss<sup>19</sup>. To study whether the maternal weight trajectories influenced the offspring's health at long  
23 term, offspring were challenged after weaning with a HFD until adulthood. At the adult age,  
24 periconceptional maternal obesity was associated to a worsening of diet-induced obesity in male.  
25 Preconceptional weight loss normalized this phenotype but was associated with a decrease of olfactory  
26 sensitivity whatever the post-weaning diet<sup>18</sup>.

27 In order to gain insight into the mechanisms associated to these metabolic outcomes, we hypothesized that  
28 maternal obesity may impact the metabolic phenotype of the offspring. We also wanted to know if  
29 preconceptional maternal weight loss, induced by a nutritional intervention, could influence it. For that, we  
30 chose a non-targeted metabolomics approach. Such a holistic analysis approach can be judicious in DOHaD  
31 to discover metabolic pathways in the offspring, associated with maternal metabolism<sup>20</sup>. To our knowledge,  
32 there are only few metabolomics studies in the context of DOHaD and most of them generally focused on the  
33 study of placenta or bio-fluids such as serum, in the context of maternal obesity<sup>21,22</sup> or in protein restricted  
34 mothers<sup>23-26</sup>. Using LC-HRMS, we analysed the metabolome of three target tissues involved in food intake  
35 and nutrient management (liver, olfactory bulb and hypothalamus) according to the maternal and post-  
36 weaning nutritional status in male mice at 6 months of age.

37

38

## 39 **Materials and methods**

40

### 41 **Sample processing and preparation**

42 The animal model has been previously described elsewhere<sup>18</sup>. Briefly, offspring born to control (CTRL),  
43 obese (OB) or weight loss after diet-induced obesity (WL) mothers were put on either a control (CD) or high  
44 fat diet (HFD), giving 6 F1 groups (Figure 1): CTRL-CD, WL-CD, OB-CD, CTRL-HFD, WL-HFD, OB-  
45 HFD. This study only focused on F1 males, the only ones with a phenotype due to maternal conditioning in  
46 adulthood. Six representative individuals of their post-weaning diet and maternal group were selected in each  
47 group, based on phenotypic and behavioural similarities using a Principal Component analysis  
48 (Supplementary data 1). The six chosen individuals were the nearest of the barycentre of their own group.  
49 We excluded individuals that presented macroscopically apparent lesions at the time of sampling, as well as  
50 animals with extreme phenotype.

51 The mass spectrometry analysis was carried out by the Profilomic company (Saclay, France) on samples  
52 prepared according to the following procedure. The liver samples were grinded with mortar and pestle in the  
53 presence of liquid nitrogen. Ground liver (LI), intact hypothalamus (HYP) and whole olfactory bulb (WOB)  
54 tissues (15 mg each) were homogenized in ultrapure cold water using a sonicator (Vibra-Cell™ 75185, Sonic  
55 & Materials, Inc.). Tissue homogenates were extracted by adding 600µl of cold methanol containing an  
56 internal standard mixture (Alanine <sup>13</sup>C; Metformin ; Ethylmalonic acid ; Aspartate <sup>15</sup>N ; Glucose <sup>13</sup>C ; 2-  
57 aminoanthracene ; Amiloride ; Imipramine ; Atropine ; Ampicillin ; Prednisone ; Colchicine ;  
58 Dihydrostreptomycin ; ATP <sup>15</sup>N), kept on ice 90 min and centrifuged at 20,000 x g for 10 min at 4°C. The  
59 aqueous phase was collected and evaporated to dryness under a stream of nitrogen (TurboVap® LV,  
60 Biotage). The dried samples were re-suspended in 10 mM ammonium carbonate pH 10.5: acetonitrile (40:60  
61 v: v) and stored at -80°C until mass spectrometry analysis.

62

### 63 **Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analyses for metabolites**

64 LC-HRMS analysis and data processing were performed using a Q-Exactive™ Hybrid Quadrupole-  
65 Orbitrap™ Mass Spectrometer coupled to a Transcend 1250 liquid chromatography system (ThermoFisher  
66 Scientific, Les Ulis, France) equipped with an aSequant ZIC-pHILIC column (Merck). Samples were  
67 analysed in high resolution (70 000 FWHM) through alternative positive and negative ionization modes.  
68 Raw data were processed and metabolites annotated in comparison with the exact mass and retention time of  
69 the Profilomic metabolites database. Annotated metabolites were compared both to the human metabolome  
70 database (HMDB) and to the chemical entities of biological interest (ChEBI) database in order to obtain  
71 accession numbers. MS/MS validation of metabolites annotation was performed by Profilomic on a subset of  
72 HFD-impacted LI metabolites and on all HFD-impacted HYP and WOB metabolites.

73

### 74 **Statistical analysis**

75 Datasets from each tissue were analysed separately. Statistical analyses were performed using the  
76 collaborative portal dedicated to metabolomics data processing, analysis and annotation for Metabolomics

77 community, Workflow4Metabolomics (W4M)<sup>27</sup>. Raw signals were log<sub>10</sub> transformed. A quality metric test,  
78 including a Hotelling's T<sub>2</sub> test on first plane of principal component analysis and z-score of intensity decile  
79 (threshold p-value = 0.001), discarded one WL-CD and one CTRL-HFD samples from the LI dataset, one  
80 WL-CD sample from the HYP dataset and one WL-HFD sample from the WOB dataset. Partial least  
81 squares–discriminant analysis (PLS-DA) was performed in each tissue, using each group (maternal group,  
82 post-weaning diet) as Y response. Transformed signals were mean-centred and divided by the standard  
83 deviation of each variable. All validated models had a significant  $Q^2Y \leq 0.001$ <sup>27</sup>. In addition, no outlier was  
84 detected in our models by the observation diagnostic. A 2-ways analysis of variance (ANOVA) with  
85 interaction testing was performed on the maternal group and the post-weaning diet. In order to decrease the  
86 bias caused by the redundancy of metabolites detected in both ionization mode, these analyses were  
87 performed separately on metabolites detected in positive and negative ionisation. The p-values were adjusted  
88 for the false discovery rate (FDR) using Benjamini-Hochberg procedure and considered significant if  $FDR \leq$   
89 0.05. For the metabolites showing a maternal group effect or interaction between the maternal group and  
90 post-weaning diet, a post-hoc test was performed on the raw signal intensity from MS peaks, using the R  
91 software (version 3.4.3), with the LSMeans package (version 2.27-62) and adjusted with the Tukey method.

92

### 93 **Over representation analysis**

94 Dataset from each tissue were analysed separately. Metabolites input type was HMDB accession numbers.  
95 Metabolites Set Enrichment Analysis–Over Representation Analysis (MSEA-ORA) were performed using  
96 the whole set of metabolites detected in each tissue and the reference database was the Profilomic  
97 metabolites database (960 compounds).

98

### 99 **Pathways analyses**

100 Dataset from each tissue were analysed separately. MetaboAnalyst tool was used with HMDB accession  
101 numbers. *Mus musculus* (KEGG) database was used as pathway library. The selected pathway enrichment  
102 analysis method was “Global ANCOVA” and the pathway topology analysis was “relative betweenness  
103 centrality”. Raw p-values were adjusted using False Discovery Rate. We chose to exclude the metabolite  
104 ADP in the liver pathway analysis because of its central place in a multitude of metabolic pathways and  
105 enzymatic reactions. We also excluded metabolites with multiple annotations as well as metabolites for  
106 which MS/MS signal did not correspond to any expected metabolites. The pathway impact score is the  
107 cumulative percentage from the matched metabolite nodes, based on the importance of each node among a  
108 pathway.

109

110

111

## 112 **Results**

113

### 114 **Nervous and non-nervous tissues display similar metabolite profiles**

115 Metabolomics investigations were performed using liquid chromatography separation followed by high-  
116 resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Up to 471, 292 and 394 variables were annotated in positive and  
117 negative ionisation mode in the liver (LI), hypothalamus (HYP) and whole olfactory bulb (WOB)  
118 respectively. They correspond to 293, 206 and 271 unique metabolites in LI, HYP and WOB, respectively.  
119 Some of these metabolites had multiple annotations (between 2 and 7 possible identities): 73 in the LI, 46 in  
120 the HYP and 68 in the WOB. Interestingly, the 5 main chemical classes of metabolites were similar for all  
121 tissues: amino acids, carbohydrates, nucleosides, lipids and organic acids. The main differences between  
122 tissues were the proportion of each chemical classes and the presence of alcohols and polyols compounds in  
123 the HYP (Figure 2).

124

### 125 **Post-weaning diets discriminate the metabolite profile of both the liver and hypothalamus**

126 Partial least square–discriminant analysis (PLS-DA) was carried out in order to detect global differences  
127 between groups for each tissue. We particularly investigated the effect of maternal groups and post-weaning  
128 diet. No model was significant for any tissue when maternal group was used as a discriminant parameter  
129 whatever the tissue. Using post-weaning diet as a discriminant parameter, robust and validated models were  
130 built for the sets of metabolites detected in the LI and HYP, but not in the WOB (Figure 3a, 3c). In the LI,  
131 CD and HFD groups were separated on the first dimension (t1) of the PLS-DA score plots ( $Q^2Y=0.917$ )  
132 (Figure 3b). In the HYP, CD and HFD groups were separated on the two first dimensions (t1 and t2) of the  
133 PLS-DA score plot ( $Q^2Y=0.74$ ) (Figure 3d). This descriptive analysis allowed us to conclude to a global  
134 effect of the post-weaning diet on the metabolite profiles of the LI and the HYP.

135

### 136 **The post-weaning diet has a major impact on metabolite abundance in the liver.**

137 Post-weaning diet effects can have masked some subtle effects of maternal group . In order to get a better  
138 evaluation of the effect of each group and interactions between them, we carried out differential analyses on  
139 each sets of metabolites using 2-ways ANOVA. In the LI, we found substantial differences in the metabolic  
140 profile according to the post-weaning diet: 108 metabolites were significantly altered, representing more than  
141 1/3 of the initial set (Figure 4a). Fold changes varied between 2.32 and -2.27 with 4 metabolites with an  
142 absolute value of fold change  $>1.5$ . The abundance of 55 metabolites was increased under HFD, while the  
143 abundance of 53 metabolites was decreased (Figure 4b).

144 In the HYP and the WOB, there were respectively 16 and 11 metabolites significantly affected by the post  
145 weaning diet (Figure 4a). Their absolute fold change values were less than 1.5 and they represented  
146 respectively 8% and 4% of the initial set of metabolites detected in the HYP and in the WOB. There were  
147 13/16 and 4/11 upregulated metabolites in the HYP and the WOB, respectively (Figure 4b). Therefore, the  
148 post-weaning diet has a significant effect on the abundance of metabolites in the LI and, to a lesser extent, in  
149 HYP and WOB (Figure 4a).



150

### 151 **Metabolic pathways and shared metabolites impacted by post weaning diet**

152 MSEA-ORA analysis showed no significant enrichment in each tissue (data not shown). Therefore pathways  
153 analyses were not biased by an over-representation of metabolites belonging to a specific class. Functional  
154 pathways enrichment analysis revealed, in the LI, an important impact (impact score > 40%) of the post-  
155 weaning diet on the metabolism of glutamine and glutamate, the biosynthesis of ubiquinone and other  
156 terpenoids-quinone, the metabolism of taurine and hypotaurine,  $\beta$ -alanine and methane. In a lesser extent  
157 (impact score between 10 and 40%), the metabolism of amino acids, lipids, carbohydrates and vitamin B was  
158 altered (Table 1). In the HYP, arginine and proline metabolism, urea cycle, and aspartate metabolism were  
159 significantly impacted by the HFD (Table 2). Lysine degradation, pantothenate and CoA biosynthesis as well  
160 as histidine metabolism were impacted by the HFD, but in a lesser extent. In the WOB, arginine and proline  
161 metabolism, pantothenate and CoA biosynthesis and lysine degradation were significantly impacted by the  
162 HFD (Table 2). Using the SMPDP (Small Molecule Pathway Database), the same pathways were retrieved  
163 in HYP. In WOB, another pathway emerges: Alpha Linolenic Acid and Linoleic Acid Metabolism (Table 2).  
164

165 Interestingly, three metabolites were impacted by post-weaning diet in the three tissues: anhydroglucitol  
166 (1,5-AG), saccharopine (Sacc) and  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HB). There was a significant decrease of 1,5-AG  
167 and Sacc abundance under HFD, while  $\beta$ -HB was increased and the magnitude of effect was similar in the  
168 three tissues (Figure 4).

169

### 170 **The liver abundance of two metabolites was impacted by maternal diet.**

171 Differential analyses revealed an effect of the maternal group on the metabolites profile of the LI only. There  
172 was an interaction between maternal group and post weaning diet for one metabolite: a pentose- or hexose-  
173 phosphate (P/H-P) which may correspond to one of the six following metabolites: D-fructose-1-phosphate,  
174 D-Fructose-6-phosphate, D-Mannose-6-phosphate, Galactose-1-phosphate, Glucose-1-phosphate or  
175 Mannose-1-phosphate. This interaction was well illustrated by a trend reversal between CTRL and OB  
176 offspring as well as a lack of HFD effect in WL offspring (Figure 5). There was also an effect of the  
177 maternal group on one other metabolite: anserine. While maternal obesity led to a decrease in anserine  
178 abundance, whatever the post-weaning diet, a preconceptional weight loss normalized it (Figure 5).

179

### 180 **Discussion**

181 Obesity extensively disturbs metabolites in both animal models and humans<sup>28,29</sup>, but the resulting changes in  
182 metabolism of specific organs or cellular organelles are not yet well understood. Moreover, there is also  
183 significant evidence that perinatal malnutrition results in several metabolic imbalances along with a greater  
184 risk for cognitive function disorders later, but the cellular metabolic explanations for this are not elucidated  
185 and only start to emerge thanks to metabolomic technologies. To date, few articles have been published  
186 concerning the characterization of the brain metabolome in a DOHaD context (maternal famine in the  
187 prefrontal cortex<sup>30</sup>; maternal obesity in both the prefrontal cortex and hippocampus<sup>31</sup>). Recent papers suggest

188 that the HYP could also be a target of maternal imbalances, as in the case of intra-uterine malnutrition<sup>26,32</sup>.  
189 However, none have explored the question in the WOB, despite its unique metabolic network architecture  
190 and its importance in the control of food intake as a metabolic sensor<sup>33,34</sup>. Our study is the first to investigate  
191 such a continuum between the HYP and the WOB in light of their modulation by metabolic imbalance. It is  
192 also one of the rare studies which compare metabolomes of non-nervous and nervous tissues. It reveals that  
193 maternal and postnatal metabolic trajectories differentially impacted the metabolism of the LI, the HYP and  
194 the WOB, thus highlighting unique, but also common cellular pathways. It shows that such a comparative  
195 analysis of the metabolome in the liver versus two central brain regions, including one under a partial blood  
196 brain barrier, could identify the metabolites that constitute specific signatures associated with nutritional  
197 challenges. Any modification of the perinatal metabolism, either due to the maternal or to the post-weaning  
198 diet, provides a specific metabolic answer which intricates common pathways.

199 As previously observed on the offspring phenotype, the metabolomics analysis confirmed recent phenotypic  
200 analyses showing that post-weaning diet had the major impact, whereas the maternal effect was more  
201 subtle<sup>18</sup>. A first striking result is that 3 metabolites were similarly impacted by HFD in LI, HYP and WOB:  
202 1,5-AG and Sacc, which were reduced, and  $\beta$ -HB, which was increased. 1,5-AG structurally resembles  
203 glucose and is associated with diabetes<sup>35</sup>. This metabolite is produced by the liver and secreted into blood  
204 circulation<sup>36,37</sup>. In mouse, streptozotocin-induced diabetes leads to a reduction of blood concentration of 1,5-  
205 AG, which is normalized by insulin injection<sup>36</sup>. In human, a low concentration of blood 1,5-AG is associated  
206 with renal defects (frequent diabetic complications), incident diabetes or hepatic cirrhosis<sup>38,39</sup>. In our model,  
207 the reduced 1,5-AG abundancy might be the direct results of the post-weaning HFD, leading to the observed  
208 diabetic-like phenotype. A hepatic defect in HFD-fed males may impact the production of this metabolite,  
209 resulting in a reduced blood concentration delivered to the other tissues of the organism, as we noticed here  
210 for HYP and WOB. Sacc is a metabolite implicated in gluconeogenesis, through its role in the propionyl-  
211 CoA synthesis pathway, and TCA cycle, through its implication in Acetyl-CoA production pathway (KEGG,  
212 SMPDB and HMDB databases). The links between this metabolite and HFD is unclear in the literature.  
213 However, we observed that the major pathway associated to variation of the metabolome in the 3 tissues is  
214 the metabolism of amino acids. We can speculate that the decrease of Sacc in our model can be related to an  
215 increased degradation of amino acids, implicated either in Acetyl-CoA production and TCA cycle, or in  
216 ketone bodies production, such as  $\beta$ -HB, implicated in energy production during fasting (KEGG, SMPDB  
217 and HMDB databases). Finally,  $\beta$ -HB is the most dynamics of the three ketone bodies. Its blood  
218 concentration is more rapidly increased than acetoacetate and acetone during ketogenesis<sup>40</sup>. Fatty acids are  
219 converted into ketone bodies by the liver that are then released in blood and used by the tissues for energy  
220 production<sup>41</sup>. In rat, western diet is known to induce an increase in  $\beta$ -HB in the cortex, along with a  
221 cumulative effect from 2 to 19 months of exposure, which fits with our observations<sup>42</sup>. In the central nervous  
222 system,  $\beta$ -HB is associated to GABAergic and glutamatergic signalling<sup>43,44</sup>. Moreover central infusion of  $\beta$ -  
223 HB leads to an increased insulin and leptin signalling potential in diabetic rat hypothalamus<sup>45</sup> and increases  
224 food intake and expression of orexigenic peptides in the HYP in another rat model<sup>46</sup>. All this may lead to the

225 modulation of food intake. The increased  $\beta$ -HB concentration in the HFD-fed male central nervous system in  
226 the present study may therefore be linked to the perturbation of their olfactory performance<sup>18</sup>. Chronic HFD  
227 may lead to an altered sensing of energetic needs and as  $\beta$ -HB can be seen as a signal of energetic  
228 deprivation, its increase is coherent with a vicious cycle of food intake perturbation<sup>47,48</sup>.

229 Apart of these three commons metabolites similarly modulated, each metabolome was affected by the post-  
230 weaning HFD diet in different ways. The LI metabolome changed massively both in the descriptive and  
231 differential statistical analysis, while the metabolomes of the HYP and WOB central tissues were less  
232 impacted. Liver metabolome was already observed as more sensitive to HFD than the one of muscle or  
233 adipose tissues<sup>49</sup>. This highlights the important plasticity of the liver towards environmental challenges,  
234 which can be related to its central role in energy homeostasis control. In the liver, HFD is associated to  
235 changes in three main metabolism pathways: amino acids, carbohydrates and lipids. These results were  
236 concordant with the literature in rodents. For example, a metabolomics study in male mice fed a HFD  
237 exhibiting obesity, insulin resistance, glucose intolerance, hyperglycaemia, such as our mice, besides hepatic  
238 steatosis, also revealed the dysregulation of carbohydrates, lipid and amino acids metabolism in liver<sup>50</sup>. A  
239 comparative study of steatohepatitis in rat (induced with methionine deficiency or HFD) and human  
240 observed that the involved pathways were similar, and concordant with our model: amino acids, lipids and  
241 bile acids metabolisms<sup>51</sup>. Plasma metabolomes of obese patients in human often show modifications of  
242 metabolites associated with lipids, carbohydrates, bile acids, amino acids, tyrosine or glutathione<sup>52-54</sup>. All  
243 this suggests that similar pathways in different species, lead to the same hepatic consequences and that  
244 plasma metabolome may reflect hepatic damages.

245 HFD-induced changes in metabolites relevant to brain function have been recently investigated following 8  
246 weeks of HFD in juvenile mice, with inconclusive results due to the lack of candidates in the HYP<sup>55</sup>. In our  
247 experimental conditions, we showed that a longer post-weaning HFD feeding (as well as qualitatively  
248 different, with lard as main lipid source instead of palm oil), impacted the amino acids, the urea cycle and the  
249 ammoniac recycling. The lysine is of particular interest, it is an essential amino acid for the brain, whose  
250 catabolism seems to be impacted through the mitochondrial Sacc pathway. This pathway has been previously  
251 considered as minor in the nervous system<sup>56</sup>. However, it seems active in adult neurons, as Sacc is a  
252 precursor of the *de novo* synthesis of glutamate, a major excitatory neurotransmitter in the brain<sup>57,58</sup>.

253 Therefore, one hypothesis is that the post-weaning HFD is associated with alterations of the neuronal  
254 synaptic transmission in the HYP. However, both the urea cycle and the ammonium recycling were also  
255 impacted, suggesting that this was due to the production of ketone bodies from the amino acids in the fasted  
256 state that helps the HYP to adjust its energetic needs, thus impacting the lysine pathway.

257 Our results show that the postnatal HFD also impacted the metabolome of the WOB in a lower extent,  
258 targeting the amino acids and fatty acids pathways. As for the HYP, the activation of the mitochondrial Sacc  
259 pathway, revealed through the SMPDB database, could have enhanced in the WOB a local production of  
260 glutamate, which is involved in the post-synaptic regulation of the olfactory message. Albeit not detected in  
261 LC-HRMS, such a modification in glutamate production might participate to the alteration in olfactory  
262 perception, as observed in behavioural studies dealing with metabolic imbalances<sup>33,59</sup>. This could explain the

263 olfactory behavioural outcomes observed in our model<sup>18</sup>. Alternatively, both amino acids- and fatty acids-  
264 sensing cells are widely expressed in the WOB<sup>60</sup> and in the HYP<sup>61</sup>. Thus, any dysregulation of brain amino  
265 acids or fatty acids abundance could also have modulated both neuronal and non-neuronal cells signalling  
266 pathways to adjust feeding behaviour according to metabolic needs, and lowered, as a consequence,  
267 olfactory sensitivity.

268 The increase in  $\gamma$ -linolenic acid level together with the decrease in dihomo- $\gamma$ -linolenic acid (8,11,14-  
269 eicosatrienoic acid) and eicosapentaenoic acid levels highlighted in the SMPDB database suggest  
270 modifications in the linolenic acid pathway in the WOB of HFD-fed animals. These variations, suggesting an  
271 alteration of delta6 desaturase, could affect the production of DHA, an essential long-chain polyunsaturated  
272 fatty acids (PUFA) from the n-3 series, particularly involved in both membrane fluidity and neuroprotective /  
273 inflammatory processes in the brain<sup>62,63</sup>. This is concordant with a series of results showing that the long-  
274 chain PUFA profile in sera is altered in obesity<sup>64</sup>. In addition, a deficiency in n-3 PUFA is associated to a  
275 diminution of the olfactory performances, with alterations of fatty acids composition and gene expression in  
276 the WOB<sup>65</sup>. Similarly, a moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of PUFA in the  
277 hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of newborns<sup>66</sup>.

278 Another originality of our experimental model, was the maternal environment modifications. To our  
279 knowledge, we are indeed the first to study the long-term effects of the maternal environment using a holistic  
280 approach in organs, since the two other known publications focused on the plasma metabolome<sup>67-69</sup>.  
281 Remarkably, two metabolites were discriminant according to the maternal group in liver: a pentose- or  
282 hexose-phosphate, which annotation could not be clarified by MS/MS, and the anserine. Anserine is  
283 produced by the methylation of the carnosine His-Ala dipeptide and is the substrate of the carnosinases that  
284 convert it into methylhistidine and  $\beta$ -alanine<sup>70,71</sup>. The intestinal absorption of anserine is known to be very  
285 stable<sup>71</sup>. This suggests that the variation reported here were rather due to an alteration of its synthesis or its  
286 conversion than an intestinal absorption perturbation. The reduction of anserine may stem from an increased  
287 activity of the conversion enzymes, which is coherent with the decrease of methylhistidine in OB offspring.  
288 Alternatively, it can originate from a reduction in the availability of the carnosine and the methyl-donor S-  
289 Adenosyl-Methionine (SAM) substrates essential for anserine production (KEGG and SMPDB databases).  
290 SAM was not different among groups in our model, but we observed an increase in its product S-adenosyl-  
291 homocysteine (SAH). SAH may also originate from the lysine to tri-methyl-lysine reaction of carnitine  
292 production pathway (KEGG and SMPDB databases). Interestingly, tri-methyl-lysine, carnitine and  
293 propionylcarnitine were all increased in our model. The competition of the pathways of anserine and  
294 carnitine production for SAM was thus coherent with the decreased anserine abundance in OB offspring. In  
295 different animal models, the induced hepatic steatosis was attenuated by a supplementation of histidine,  
296 carnosine or chicken liver, which is rich in anserine and carnosine<sup>72-75</sup>. In a mouse model where steatosis was  
297 induced by thioacetamide injection, the intraperitoneal injection of chicken liver extract led to a reduction of  
298 the inflammation signalling of the TNF- $\alpha$  and an increased anti-oxidant signalling<sup>75</sup>. Anserine has therefore  
299 a hepatoprotective action. In our model, anserine was decreased in both CD- and HFD-fed OB offspring, but

300 the increased bodyweight phenotype was only present in OB-HFD males. Oxidative stress and chronic low-  
301 grade inflammation are consequences of diet-induced obesity. Therefore the reduction of anserine in OB  
302 offspring might have few metabolic consequences in a CD context but was concordant with increased  
303 metabolic susceptibility of HFD-fed males. The OB-HFD offspring liver could thus be affected more rapidly  
304 by the metabolic disorders, induced by the hyperlipidic diet, thus favouring NAFLD and the development of  
305 obesity. Interestingly, anserine in WL offspring was equivalent than in CTRL, confirming our previous  
306 observation of beneficial maternal weight loss for metabolic outcomes in offspring<sup>18</sup>.

307 In conclusion, this study is the first to characterize the metabolome of three tissues of the same animals, in  
308 the context of obesity. This is also the first to report long-term effects of maternal preconceptional obesity on  
309 the offspring metabolome and to identify which metabolic pathways are sensitive to its preconceptional  
310 reversion, in the liver. We revealed a major impact of the post weaning diet, particularly on the amino acids  
311 metabolism, in the three tissues. We confirmed the metabolic plasticity of the liver and the relative stability  
312 of the two studied central tissues. Strikingly, we observed a reduction of anserine abundance in the liver of  
313 offspring born to obese mothers, which can explain the increased diet-induced obesity conditioned by  
314 maternal environment in our model. Overall, this opens new perspectives in the field of obesity management  
315 and in the development of therapeutic approaches, to mitigate the detrimental effects of maternal obesity.

316

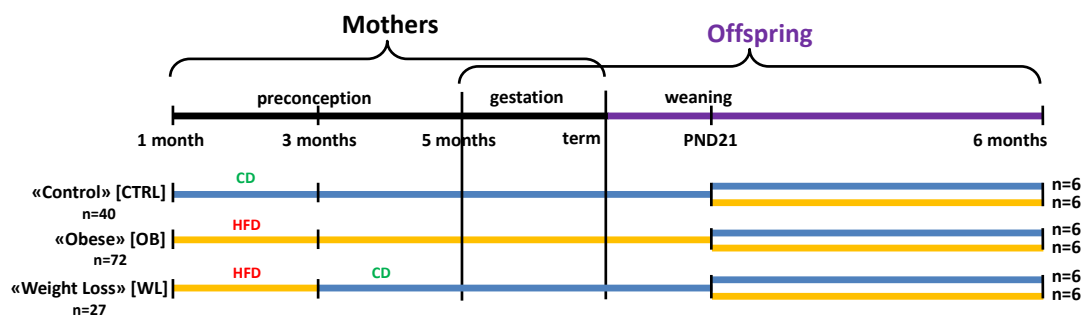
317 **References**

- 318 1. OMS. Obésité et surpoids. (2018).
- 319 2. Lee, C. Y. W. & Koren, G. Maternal obesity: Effects on pregnancy and the role of pre-conception counselling. *J.*  
320 *Obstet. Gynaecol.* **30**, 101–106 (2010).
- 321 3. Rajasingam, D., Seed, P. T., Briley, A. L., Shennan, A. H. & Poston, L. A prospective study of pregnancy outcome  
322 and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **200**, 395.e1-395.e9  
323 (2009).
- 324 4. Gaudet, L., Ferraro, Z. M., Wen, S. W. & Walker, M. Maternal Obesity and Occurrence of Fetal Macrosomia: A  
325 Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–22 (2014).
- 326 5. Acosta, O. *et al.* Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers. *Am. J.*  
327 *Obstet. Gynecol.* **212**, 227.e1-227.e7 (2015).
- 328 6. Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P. M. & Charron, M. J. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A  
329 review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1842**, 507–519 (2014).
- 330 7. HAS. Surpoids et obésité de l'adulte : prise en charge médicale de premier recours. (2011).
- 331 8. Forsum, E., Lise Brantsæter, A., Olafsdottir, A.-S., Olsen, SjurduF. & Thorsdottir, I. Weight loss before  
332 conception: A systematic literature review. *Food Nutr. Res.* **57**, 20522 (2013).
- 333 9. Dearden, L. & Ozanne, S. E. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic  
334 pathways controlling energy homeostasis. *Front. Neuroendocrinol.* **39**, 3–16 (2015).
- 335 10. McCurdy, C. E. *et al.* Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J. Clin.*  
336 *Invest.* (2009). doi:10.1172/JCI32661
- 337 11. Plata, M. *et al.* Critical periods of increased fetal vulnerability to a maternal high fat diet. *Reprod. Biol. Endocrinol.*  
338 **12**, 80 (2014).
- 339 12. Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O. & Leibowitz, S. F. Maternal High-Fat Diet and Fetal Programming:  
340 Increased Proliferation of Hypothalamic Peptide-Producing Neurons That Increase Risk for Overeating and  
341 Obesity. *J. Neurosci.* **28**, 12107–12119 (2008).
- 342 13. Sanders, T. R., Kim, D. W., Glendining, K. A. & Jasoni, C. L. Maternal Obesity and IL-6 Lead to Aberrant  
343 Developmental Gene Expression and Deregulated Neurite Growth in the Fetal Arcuate Nucleus. *Endocrinology*  
344 **155**, 2566–2577 (2014).
- 345 14. Vogt, M. C. *et al.* Neonatal Insulin Action Impairs Hypothalamic Neurocircuit Formation in Response to Maternal  
346 High-Fat Feeding. *Cell* **156**, 495–509 (2014).
- 347 15. Sullivan, E. L., Riper, K. M., Lockard, R. & Valteau, J. C. Maternal high-fat diet programming of the  
348 neuroendocrine system and behavior. *Horm. Behav.* **76**, 153–161 (2015).
- 349 16. Peleg-Raibstein, D. *et al.* Enhanced sensitivity to drugs of abuse and palatable foods following maternal  
350 overnutrition. *Transl. Psychiatry* **6**, e911–e911 (2016).
- 351 17. Merle, L. *et al.* Maternal high fat high sugar diet disrupts olfactory behavior but not mucosa sensitivity in the  
352 offspring. *Psychoneuroendocrinology* **104**, 249–258 (2019).
- 353 18. Panchenko, P. E. *et al.* Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female  
354 Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice. *Nutrients* **11**, 948 (2019).
- 355 19. Panchenko, P. E. *et al.* Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss  
356 in relation to fetal growth in mice. *Clin. Epigenetics* **8**, (2016).
- 357 20. Hivert, M. F. *et al.* Metabolomics in the developmental origins of obesity and its cardiometabolic consequences. *J.*  
358 *Dev. Orig. Health Dis.* **6**, 65–78 (2015).
- 359 21. Rauschert, S. *et al.* Early Programming of Obesity Throughout the Life Course: A Metabolomics Perspective. *Ann.*  
360 *Nutr. Metab.* **70**, 201–209 (2017).
- 361 22. Paul, H. A., Collins, K. H., Bomhof, M. R., Vogel, H. J. & Reimer, R. A. Potential Impact of Metabolic and Gut  
362 Microbial Response to Pregnancy and Lactation in Lean and Diet-Induced Obese Rats on Offspring Obesity Risk.  
363 *Mol. Nutr. Food Res.* **62**, 1700820 (2018).
- 364 23. Preidis, G. A. *et al.* The Undernourished Neonatal Mouse Metabolome Reveals Evidence of Liver and Biliary  
365 Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress. *J. Nutr.* **144**, 273–281 (2014).
- 366 24. Agnoux, A. M. *et al.* Time window-dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity  
367 and energy substrate oxidation in adult male offspring. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R184–  
368 R197 (2014).
- 369 25. Sato, N. *et al.* Early gestational maternal low-protein diet diminishes hepatic response to fasting in young adult  
370 male mice. *Sci. Rep.* **7**, 9812 (2017).
- 371 26. Pedroso, A. P. *et al.* Intrauterine Growth Restriction Programs the Hypothalamus of Adult Male Rats: Integrated  
372 Analysis of Proteomic and Metabolomic Data. *J. Proteome Res.* **16**, 1515–1525 (2017).
- 373 27. Giacomoni, F. *et al.* Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational  
374 metabolomics. *Bioinformatics* **31**, 1493–1495 (2015).
- 375 28. Abu Bakar, M. H. *et al.* Metabolomics – the complementary field in systems biology: a review on obesity and type  
376 2 diabetes. *Mol. Biosyst.* **11**, 1742–1774 (2015).
- 377 29. Park, S., Sadanala, K. C. & Kim, E. K. A Metabolomic Approach to Understanding the Metabolic Link between  
378 Obesity and Diabetes. *Mol. Cells* **38**, 587–596 (2015).

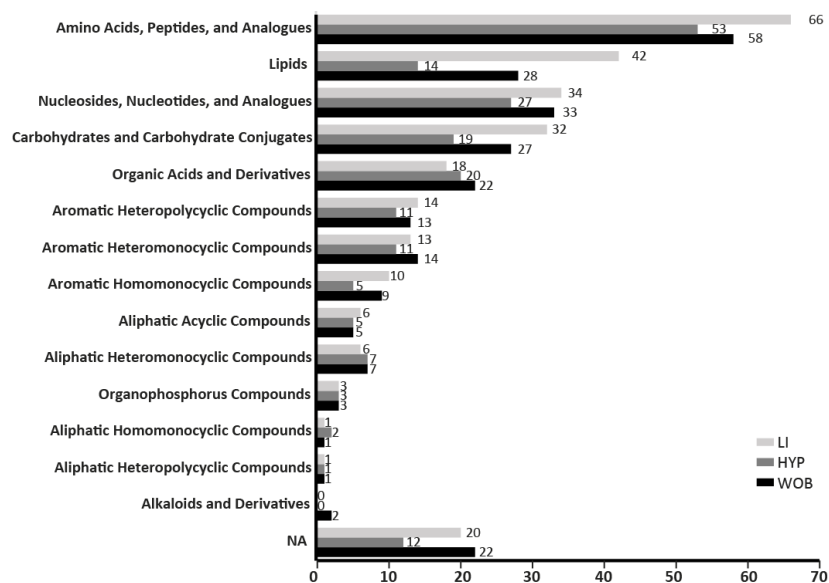
- 379 30. Xu, F. *et al.* Metabolomic profiling on rat brain of prenatal malnutrition: implicated for oxidative stress and  
380 schizophrenia. *Metab. Brain Dis.* (2019). doi:10.1007/s11011-019-00468-3
- 381 31. Zhu, C. *et al.* A mouse model of pre-pregnancy maternal obesity combined with offspring exposure to a high-fat  
382 diet resulted in cognitive impairment in male offspring. *Exp. Cell Res.* **368**, 159–166 (2018).
- 383 32. Pedroso, A. P. *et al.* A proteomics–metabolomics approach indicates changes in hypothalamic glutamate–GABA  
384 metabolism of adult female rats submitted to intrauterine growth restriction. *Eur. J. Nutr.* (2018).  
385 doi:10.1007/s00394-018-1851-6
- 386 33. Palouzier-Paulignan, B. *et al.* Olfaction Under Metabolic Influences. *Chem. Senses* **37**, 769–797 (2012).
- 387 34. Choi, W. T. *et al.* Metabolomics of mammalian brain reveals regional differences. *BMC Syst. Biol.* **12**, 127 (2018).
- 388 35. Kim, W. J. & Park, C.-Y. 1,5-Anhydroglucitol in diabetes mellitus. *Endocrine* **43**, 33–40 (2013).
- 389 36. Yamanouchi, T., Akanuma, H., Takaku, F. & Akanuma, Y. Marked Depletion of Plasma 1,5-Anhydroglucitol, a  
390 Major Polyol, in Streptozocin-induced Diabetes in Rats and the Effect of Insulin Treatment. **35**, 6 (1986).
- 391 37. Li, L. O. *et al.* Early Hepatic Insulin Resistance in Mice: A Metabolomics Analysis. *Mol. Endocrinol.* **24**, 657–666  
392 (2010).
- 393 38. Yamagishi, S. & Ohta, M. Serum 1,5-anhydro- d -glucitol levels in liver cirrhosis. *Acta Diabetol.* **35**, 65–66  
394 (1998).
- 395 39. Selvin, E. *et al.* Association of 1,5-Anhydroglucitol with Diabetes and Microvascular Conditions. *Clin. Chem.* **60**,  
396 1409–1418 (2014).
- 397 40. Lincoln, B. C., Rosiers, C. D. & Brunengraber, H. Metabolism of S-3-hydroxybutyrate in the perfused rat liver.  
398 *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 149–156 (1987).
- 399 41. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry.* (W.H. Freeman, 2012).
- 400 42. Roy, M. *et al.* Long-term calorie restriction has minimal impact on brain metabolite and fatty acid profiles in aged  
401 rats on a Western-style diet. *Neurochem. Int.* **63**, 450–457 (2013).
- 402 43. Ma, W., Berg, J. & Yellen, G. Ketogenic Diet Metabolites Reduce Firing in Central Neurons by Opening KATP  
403 Channels. *J. Neurosci.* **27**, 3618–3625 (2007).
- 404 44. Juge, N. *et al.* Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release. *Neuron* **68**, 99–112 (2010).
- 405 45. Park, S., Kim, D. S. & Daily, J. W. Central infusion of ketone bodies modulates body weight and hepatic insulin  
406 sensitivity by modifying hypothalamic leptin and insulin signaling pathways in type 2 diabetic rats. *Brain Res.*  
407 **1401**, 95–103 (2011).
- 408 46. Carneiro, L. *et al.* Evidence for hypothalamic ketone body sensing: impact on food intake and peripheral metabolic  
409 responses in mice. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **310**, E103–E115 (2016).
- 410 47. Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. A., Mizioro, H. M. & Levin, B. E. Role of VMH ketone bodies in adjusting caloric  
411 intake to increased dietary fat content in DIO and DR rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **308**,  
412 R872–R878 (2015).
- 413 48. Rojas-Morales, P., Tapia, E. & Pedraza-Chaverri, J.  $\beta$ -Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation  
414 response? *Cell. Signal.* **28**, 917–923 (2016).
- 415 49. Wells, A. *et al.* Tissue Level Diet and Sex-by-Diet Interactions Reveal Unique Metabolite and Clustering Profiles  
416 Using Untargeted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry on Adipose, Skeletal Muscle, and Liver Tissue in  
417 C57BL6/J Mice. *J. Proteome Res.* **17**, 1077–1090 (2018).
- 418 50. Soltis, A. R. *et al.* Hepatic Dysfunction Caused by Consumption of a High-Fat Diet. *Cell Rep.* **21**, 3317–3328  
419 (2017).
- 420 51. Han, J. *et al.* Metabolomic profiling distinction of human nonalcoholic fatty liver disease progression from a  
421 common rat model: Metabolomic Profiling of Human and Rodent NAFLD. *Obesity* **25**, 1069–1076 (2017).
- 422 52. Kalhan, S. C. *et al.* Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **60**, 404–413  
423 (2011).
- 424 53. Jin, R. *et al.* Amino Acid Metabolism is Altered in Adolescents with Nonalcoholic Fatty Liver Disease—An  
425 Untargeted, High Resolution Metabolomics Study. *J. Pediatr.* **172**, 14–19.e5 (2016).
- 426 54. Ahmad, M. S. *et al.* Metabolic Phenotype of Obesity in a Saudi Population. *J. Proteome Res.* **16**, 635–644 (2017).
- 427 55. Hassan, A. M. *et al.* High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in  
428 microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. *Nutr. Neurosci.* 1–17 (2018).  
429 doi:10.1080/1028415X.2018.1465713
- 430 56. Hallen, A., Jamie, J. F. & Cooper, A. J. L. Lysine metabolism in mammalian brain: an update on the importance of  
431 recent discoveries. *Amino Acids* **45**, 1249–1272 (2013).
- 432 57. Papes, F., Surpili, M. J., Langone, F., Trigo, J. R. & Arruda, P. The essential amino acid lysine acts as precursor of  
433 glutamate in the mammalian central nervous system. *FEBS Lett.* **488**, 34–38 (2001).
- 434 58. Crowther, L. M., Mathis, D., Poms, M. & Plecko, B. New insights into human lysine degradation pathways with  
435 relevance to pyridoxine-dependent epilepsy due to antiquitin deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* jimd.12076 (2019).  
436 doi:10.1002/jimd.12076
- 437 59. Lacroix, M.-C. *et al.* Long-Lasting Metabolic Imbalance Related to Obesity Alters Olfactory Tissue Homeostasis  
438 and Impairs Olfactory-Driven Behaviors. *Chem. Senses* **40**, 537–556 (2015).
- 439 60. Julliard, A.-K., Al Koborssy, D., Fadool, D. A. & Palouzier-Paulignan, B. Nutrient Sensing: Another  
440 Chemosensitivity of the Olfactory System. *Front. Physiol.* **8**, (2017).

- 441 61. Lazutkaite, G., Soldà, A., Lossow, K., Meyerhof, W. & Dale, N. Amino acid sensing in hypothalamic tanycytes via  
442 umami taste receptors. *Mol. Metab.* **6**, 1480–1492 (2017).
- 443 62. Domenichiello, A. F., Kitson, A. P. & Bazinet, R. P. Is docosahexaenoic acid synthesis from  $\alpha$ -linolenic acid  
444 sufficient to supply the adult brain? *Prog. Lipid Res.* **59**, 54–66 (2015).
- 445 63. Calder, P. C. Docosahexaenoic Acid. *Ann. Nutr. Metab.* **69**, 8–21 (2016).
- 446 64. Fekete, K. *et al.* Long-chain polyunsaturated fatty acid status in obesity: a systematic review and meta-analysis:  
447 Meta-analysis of fatty acid status in obesity. *Obes. Rev.* **16**, 488–497 (2015).
- 448 65. Hichami, A. *et al.* Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, Gir and Glut1 mRNA are altered  
449 in n-3 fatty acid-depleted rats. *Behav. Brain Res.* **184**, 1–10 (2007).
- 450 66. Ramírez-López, M. T. *et al.* A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and  
451 endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of rat offspring in a sex-  
452 specific manner. *PLOS ONE* **12**, e0174307 (2017).
- 453 67. Alexandre-Gouabau, M.-C. *et al.* Offspring Metabolomic Response to Maternal Protein Restriction in a Rat Model  
454 of Intrauterine Growth Restriction (IUGR). *J. Proteome Res.* **10**, 3292–3302 (2011).
- 455 68. Dellschaft, N. S. *et al.* Effect of pre- and postnatal growth and post-weaning activity on glucose metabolism in the  
456 offspring. *J. Endocrinol.* **224**, 171–182 (2015).
- 457 69. Chao De La Barca, J. M. *et al.* Metabolome and mass spectrometry: new biomedical analysis perspectives. *Ann.*  
458 *Biol. Clin. (Paris)* **73**, 126–130 (2015).
- 459 70. McManus, R. Enzymatic SYNthesis of Anserine in Skeletal Muscle by N-Methylation of Carnosine. *J. Biol. Chem.*  
460 **237**, (1962).
- 461 71. Kubomura, D., Matahira, Y., Masui, A. & Matsuda, H. Intestinal Absorption and Blood Clearance of L -Histidine-  
462 Related Compounds after Ingestion of Anserine in Humans and Comparison to Anserine-Containing Diets. *J.*  
463 *Agric. Food Chem.* **57**, 1781–1785 (2009).
- 464 72. Mong, M., Chao, C. & Yin, M. Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high  
465 saturated fat diet. *Eur. J. Pharmacol.* **653**, 82–88 (2011).
- 466 73. Chou, C.-H., Wang, S.-Y., Lin, Y.-T. & Chen, Y.-C. Antioxidant activities of chicken liver hydrolysates by pepsin  
467 treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**, 1654–1662 (2014).
- 468 74. Yang, K.-T., Lin, C., Liu, C.-W. & Chen, Y.-C. Effects of chicken-liver hydrolysates on lipid metabolism in a  
469 high-fat diet. *Food Chem.* **160**, 148–156 (2014).
- 470 75. Chen, P.-J. *et al.* Protective Effects of Functional Chicken Liver Hydrolysates against Liver Fibrogenesis:  
471 Antioxidation, Anti-inflammation, and Antifibrosis. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 4961–4969 (2017).
- 472

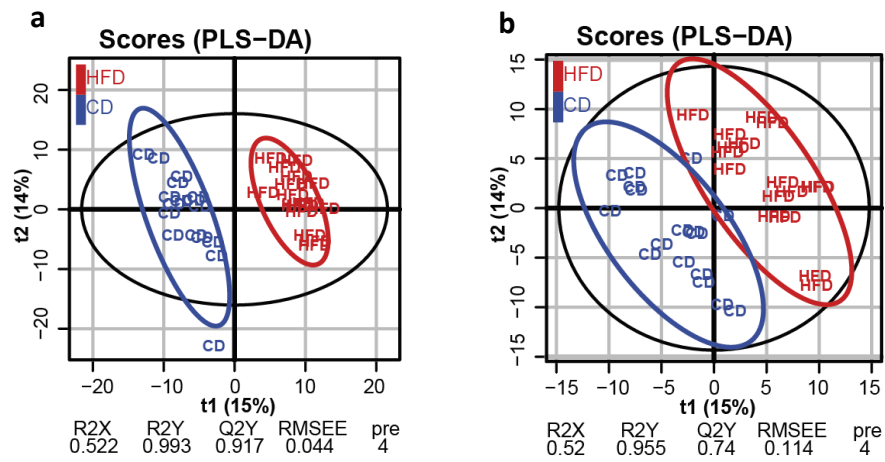




**Figure 1. Animal model of preconceptional maternal weight trajectories.** C57BL/6J females were fed a control diet (CD, blue bars) or high fat diet (HFD, yellow bars). In mothers: A first group was under CD (CTRL) and a second group was under HFD (OB) throughout the study. In the third group, after 2 months of HFD, diet was switched to CD (WL). Mothers were mated after 4 months of preconceptional diet with males under CD. At weaning (postnatal day 21, PND21), offspring were weaned onto CD or HFD to obtain 6 groups: CD-CD, CD-HFD, OB-CD, OB-HFD, WL-CD and WL-HFD. All male offspring were followed up longitudinally up to 6 months of age. At 6 months of age offspring were sacrificed, tissues and organs were sampled, flash frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Number of animals in this study (n) is indicated for each group.

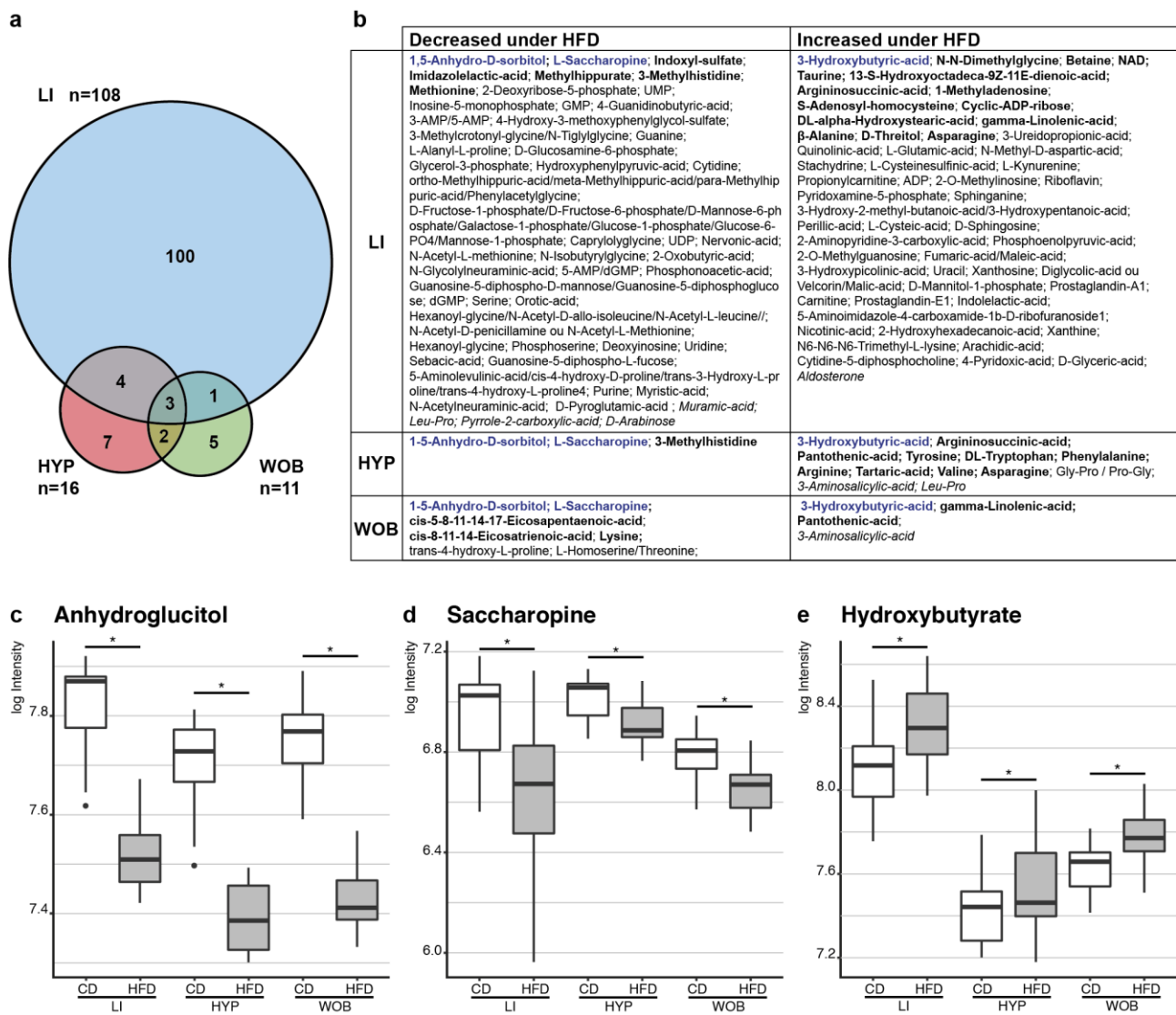


**Figure 2: The initial set of metabolites analysed in the 3 tissues (LI, HYP, WOB), does not differ according to the categories of metabolites.**



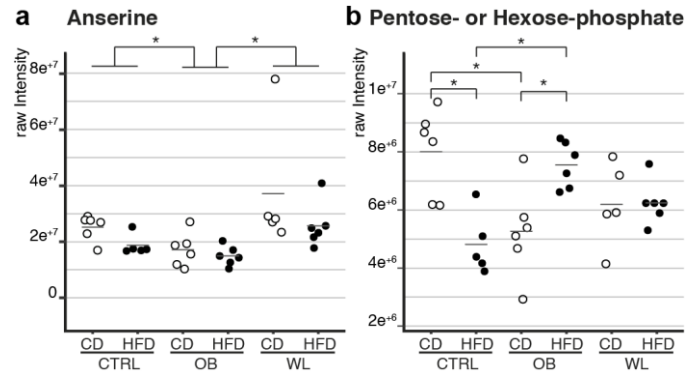
**Figure 3. The post-weaning HFD has a global impact on liver and hypothalamus metabolome.**

Score plots from PLS-DA classification between HFD and CD groups in the liver (a) and hypothalamus (b).



**Figure 4. Impact of HFD In the three tissues.**

(a) Venn diagram representing the number of discriminant metabolites between CD-fed or HFD-fed male mice. (b) Table list of the discriminant metabolites between CD-fed or HFD-fed male mice. Bold/italic characters indicate metabolites validated/discarded by MS/MS respectively; regular characters indicate metabolites for which annotation could not have been specified by MS/MS, or not tested. Blue metabolites are similarly impacted by HFD in the 3 tissues. There was a significant decrease of anhydroglucitol (c) and saccharopine (d) abundance in HFD-fed compared to CD-fed mice, and a significant increase in hydroxybutyrate (e) abundance. (\*adjusted  $p < 0.05$ ).



**Figure 5. Liver pentose-phosphate and anserine were affected by the maternal diet group.**

(a) In the OB offspring, the anserine abundance was significantly decreased compared to CTRL and WL offspring. In the WL offspring, the anserine abundance did not differ from that of the CTRL offspring. This effect was independent of the post-weaning diet.

(b) In the CTRL offspring, the abundance of P/H-P was significantly decreased in response to the HFD. In the OB offspring, there was a reversed trend: the abundance of P/H-P was significantly increased in response to the HFD. Furthermore, CTRL-CD and OB-CD offspring were significantly different from each other, as well as CTRL-HFD and OB-HFD offspring. Finally, WL-CD and WL-HFD were not significantly different from other offspring groups.

(\*adjusted  $p < 0.05$ ).

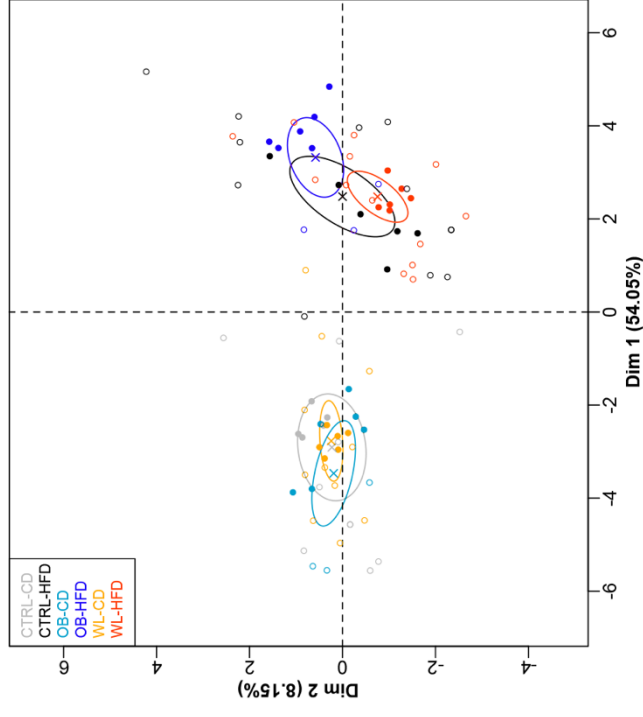
**Table 1: Pathway (KEGG) enrichment analysis in liver between males fed a HFD and CD.**

	Total Compound	Hits	FDR	Impact	Metabolites
<b>Liver</b>					
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	5	1	0.000019	100%	L-Glutamic acid ↗
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	3	1	0.006445	100%	4-Hydroxyphenylpyruvic acid ↘
Taurine and hypotaurine metabolism	8	3	0.000019	71%	Cysteic acid ↗; 3-Sulfinoalanine ↗; Taurine ↗
beta-Alanine metabolism	17	3	0.000011	67%	Beta-Alanine ↗; Ureidopropionic acid ↗; Uracil ↗
Methane metabolism	9	1	0.020487	40%	L-Serine ↘
Glycine, serine and threonine metabolism	31	5	0.000006	36%	L-Serine ↘; Glyceric acid ↗; Betaine ↗; Dimethylglycine ↗; Phosphoserine ↘
Purine metabolism	68	8	0.000008	28%	Xanthine ↗; AICAR ↗; Inosinic acid ↘; Deoxyinosine ↘; Xanthosine ↗; Guanosine monophosphate ↘; Guanine ↘; 2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate ↘
Pyrimidine metabolism	41	8	0.000005	28%	Uridine 5'-diphosphate ↘; Uridine 5'-monophosphate ↘; Uridine ↗; Ureidopropionic acid ↗; Cytidine ↗; Orotic acid ↗; Uracil ↗; Beta-Alanine ↗
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	4	0.000005	28%	Argininosuccinic acid ↗; L-Glutamic acid ↗; L-Asparagine ↘; Glucosamine 6-phosphate ↘
Nicotinate and nicotinamide metabolism	13	3	0.000008	21%	Quinolinic acid ↗; NAD ↗; Nicotinic acid ↗
Cysteine and methionine metabolism	27	6	0.000006	20%	L-Serine ↘; L-Methionine ↗; S-Adenosylhomocysteine ↗; Cysteic acid ↗; 3-Sulfinoalanine ↗; 2-Ketobutyric acid ↘
Sphingolipid metabolism	21	3	0.000046	20%	Sphinganine ↗; L-Serine ↘; Sphingosine ↗
Glycerolipid metabolism	18	2	0.000191	13%	Glycerol 3-phosphate ↘; Glyceric acid ↗
Glycerophospholipid metabolism	30	2	0.000115	13%	Citicoline ↗; Glycerol 3-phosphate ↘
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	69	4	0.000376	13%	L-Asparagine ↘; L-Serine ↘; L-Methionine ↗; L-Glutamic acid ↗
Arginine and proline metabolism	44	3	0.000005	12%	Argininosuccinic acid ↗; L-Glutamic acid ↗; 4-Guanidinobutanoic acid ↘
Tryptophan metabolism	40	1	0.000564	11%	L-Kynurenine ↘
Glycolysis or Gluconeogenesis	26	1	0.000322	10%	Phosphoenolpyruvic acid ↗
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	37	3	0.000197	8%	Glucosamine 6-phosphate ↘; GDP-L-fucose ↘; N-Glycolylneuraminic acid ↘
Tyrosine metabolism	44	1	0.006445	7%	4-Hydroxyphenylpyruvic acid ↘
Pentose phosphate pathway	19	1	0.000019	7%	Deoxyribose 5-phosphate ↘
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	18	1	0.000322	6%	Glyceric acid ↗
Glutathione metabolism	26	1	0.000019	6%	L-Glutamic acid ↗
Vitamin B6 metabolism	9	2	0.000022	5%	Pyridoxamine 5'-phosphate ↗; 4-Pyridoxic acid ↗
Pantothenate and CoA biosynthesis	15	3	0.000011	4%	Ureidopropionic acid ↗; Beta-Alanine ↗; Uracil ↗
Primary bile acid biosynthesis	46	1	0.000024	3%	Taurine ↗
Lysine degradation	23	2	0.000011	1%	N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine ↗; Saccharopine ↘
Histidine metabolism	15	2	0.000011	0%	L-Glutamic acid ↗; 1-Methylhistidine ↘
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	42	3	0.000014	0%	Nervonic acid ↘; Arachidic acid ↗; Gamma-Linolenic acid ↗
Butanoate metabolism	22	1	0.000019	0%	L-Glutamic acid ↗
Porphyrin and chlorophyll metabolism	27	1	0.000019	0%	L-Glutamic acid ↗
Nitrogen metabolism	9	1	0.000019	0%	L-Glutamic acid ↗
Propanoate metabolism	20	2	0.000025	0%	Beta-Alanine ↗; 2-Ketobutyric acid ↘
Linoleic acid metabolism	6	1	0.000025	0%	13S-hydroxyoctadecadienoic acid ↗
Limonene and pinene degradation	8	1	0.000106	0%	Perillic acid ↗
Riboflavin metabolism	11	1	0.000115	0%	Riboflavin ↗
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	0.000322	0%	Phosphoenolpyruvic acid ↗
Pyruvate metabolism	23	1	0.000322	0%	Phosphoenolpyruvic acid ↗
Lysine biosynthesis	4	1	0.004660	0%	Saccharopine ↘
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	1	0.006445	0%	4-Hydroxyphenylpyruvic acid ↘
Cyanoamino acid metabolism	6	1	0.020487	0%	L-Serine ↘

**Table 2: Pathway (KEGG or SMPDB) enrichment analysis central tissues (hypothalamus and whole olfactory bulb) between males fed a HFD and CD.**

	Total Compound	Hits	FDR	Impact	Metabolites
<b>Hypothalamus (KEGG and SMPDB databases retrieved the same results)</b>					
Aspartate Metabolism	34	3	0.008183	35%	L-Asparagine ↗, Argininosuccinic acid ↗,
Arginine and Proline Metabolism	48	2	0.005862	24%	L-Arginine ↗, Argininosuccinic acid ↗, L-Arginine ↗
Urea Cycle	23	2	0.005862	22%	Argininosuccinic acid ↗, L-Arginine ↗
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	25	2	0.019214	12%	L-Phenylalanine ↗, L-Tyrosine ↗
Pantothenate and CoA Biosynthesis	19	1	0.005862	7%	Pantothenic acid ↗
Ammonia Recycling	25	1	0.036695	3%	L-Asparagine ↗
Lysine Degradation	20	1	0.019214	3%	Saccharopine ↘
Beta-Alanine Metabolism	26	2	0.005862	0%	3-Methylhistidine ↗, Pantothenic acid ↗
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	51	1	0.020303	0%	L-Valine ↗
Catecholamine Biosynthesis	14	1	0.030647	0%	L-Tyrosine ↗
Tyrosine Metabolism	55	1	0.030647	0%	L-Tyrosine ↗
<b>Whole olfactory bulb (KEGG database)</b>					
Arginine and proline metabolism	44	1	0.002333	4%	Hydroxyproline ↘
Pantothenate and CoA biosynthesis	15	1	0.004302	2%	Pantothenic acid ↗
Lysine degradation	23	2	0.000154	1%	L-Lysine ↘; Saccharopine ↘
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	42	3	0.000154	0%	8,11,14-Eicosatrienoic acid ↘; Gamma-Linolenic acid ↗; Eicosapentaenoic acid ↘
Lysine biosynthesis	4	2	0.000154	0%	L-Lysine ↘; Saccharopine ↘
Biotin metabolism	5	1	0.004302	0%	L-Lysine ↘
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	69	1	0.004302	0%	L-Lysine ↘
<b>Whole olfactory bulb (SMPDB database)</b>					
Alpha Linolenic Acid and Linoleic Acid Metabolism	17	3	0.000318	26%	Eicosapentaenoic acid ↘; 8,11,14-Eicosatrienoic acid ↘; Gamma-Linolenic acid ↗
Lysine Degradation	20	2	0.183970	3%	L-Lysine ↘; Saccharopine ↘
Biotin Metabolism	7	1	0.722550	0%	L-Lysine ↘
Carnitine Synthesis	16	1	0.722550	0%	L-Lysine ↘

### Confidence ellipses around the categories of group



### Supplementary data 1: Selection of the individuals for LC-HRMS.

The Principal Component Analysis analyzing all the phenotypic characteristics listed in the table below allowed the selection of 6 males per groups. On the figure presented on the right, each circle represents one individual, the color of which is according to its group in the legend. The plain circles represent the 6 selected individuals, the coordinates of which are closer to the barycenter of their own group. The table below lists the phenotypic characteristics, with the grey line corresponding to the whole group population and the white line, the mean of the 6 selected individual.

	WRIGHT (g)	WATSC/BW	WATPG/BW	WATPR/BW	TotalWAT/BW	KIDNEYs/BW	HEART/BW	BA7/BW	LIVER/BW	Cholesterolemia (mmol/L)	Fasting Glycemia (mg/dl)	AUC (mg.min/dl)	Fasting Insulinemia (pmol/L)	Leptinemia (ng/mL)	Food intake (Kcal/kg BW/d)	Hidden Cheese Test (s)	Olfactory Preference	EOG amplitude (mV)
Mean CTRL-CD group (n=14)	28.58 ± 2.66	0.0253 ± 0.0082	0.0326 ± 0.0130	0.0135 ± 0.0056	0.0714 ± 0.0258	0.0117 ± 0.0020	0.0053 ± 0.0009	0.0051 ± 0.0015	0.0341 ± 0.0136	2.961 ± 1.474	155.21 ± 15.30	21897.74 ± 2941.96	158.11 ± 61.90	7.31 ± 5.67	437.32 ± 79.00	212.29 ± 90.15	0.480 ± 0.266	16.388 ± 3.612
Mean CTRL-CD Individuals (n=6)	28.49 ± 2.94	0.0262 ± 0.0034	0.0355 ± 0.0117	0.0151 ± 0.0052	0.0767 ± 0.0194	0.0105 ± 0.0006	0.0048 ± 0.0004	0.0058 ± 0.0016	0.0391 ± 0.0035	4.021 ± 0.489	159.67 ± 11.90	23654.31 ± 761.25	155.75 ± 34.69	8.79 ± 6.44	405.75 ± 30.37	190.00 ± 107.29	0.543 ± 0.362	15.292 ± 2.111
Mean CTRL-HFD group (n=17)	41.71 ± 5.46	0.0675 ± 0.0094	0.0575 ± 0.0162	0.0334 ± 0.0062	0.1584 ± 0.0157	0.0086 ± 0.0011	0.0041 ± 0.0007	0.0070 ± 0.0027	0.0324 ± 0.0088	5.582 ± 1.486	192.53 ± 43.98	30781.96 ± 5424.04	632.89 ± 382.26	58.12 ± 19.31	325.21 ± 41.24	245.38 ± 86.60	0.597 ± 0.282	14.987 ± 1.818
Mean CTRL-HFD Individuals (n=6)	41.13 ± 4.75	0.0635 ± 0.0091	0.0604 ± 0.0143	0.0326 ± 0.0041	0.1565 ± 0.0083	0.0086 ± 0.0007	0.0041 ± 0.0005	0.0069 ± 0.0022	0.0314 ± 0.0064	5.361 ± 1.456	175.90 ± 19.37	29920.50 ± 1608.34	596.13 ± 301.13	55.22 ± 21.87	331.05 ± 36.22	244.40 ± 79.84	0.527 ± 0.116	13.256 ± 0.659
Mean OB-CD group (n=9)	28.97 ± 2.79	0.0233 ± 0.0046	0.0310 ± 0.0109	0.0115 ± 0.0031	0.0658 ± 0.0172	0.0126 ± 0.0017	0.0059 ± 0.0010	0.0047 ± 0.0009	0.0347 ± 0.0069	3.005 ± 1.159	154.22 ± 17.77	21075.74 ± 2648.56	151.82 ± 38.98	5.97 ± 3.12	466.10 ± 79.21	202.89 ± 104.01	0.418 ± 0.285	14.234 ± 4.033
Mean OB-CD Individuals (n=6)	28.40 ± 2.28	0.0238 ± 0.0052	0.0333 ± 0.0116	0.0117 ± 0.0030	0.0689 ± 0.0180	0.0124 ± 0.0014	0.0056 ± 0.0011	0.0048 ± 0.0009	0.0357 ± 0.0069	2.964 ± 1.222	155.42 ± 18.89	21541.94 ± 3014.40	163.69 ± 39.27	5.70 ± 3.24	452.24 ± 82.89	193.00 ± 106.02	0.434 ± 0.319	13.587 ± 4.498
Mean OB-HFD group (n=9)	46.34 ± 3.42	0.0751 ± 0.0141	0.0487 ± 0.0074	0.0402 ± 0.0069	0.1640 ± 0.0197	0.0091 ± 0.0011	0.0042 ± 0.0008	0.0087 ± 0.0047	0.0342 ± 0.0059	5.950 ± 1.842	198.83 ± 19.16	35913.61 ± 7126.54	667.91 ± 314.17	68.47 ± 15.31	311.72 ± 39.34	287.33 ± 38.00	0.519 ± 0.334	14.783 ± 2.530
Mean OB-HFD Individuals (n=6)	47.37 ± 1.85	0.0721 ± 0.0113	0.0476 ± 0.0062	0.0427 ± 0.0056	0.1624 ± 0.0134	0.0087 ± 0.0011	0.0038 ± 0.0007	0.0105 ± 0.0048	0.0330 ± 0.0048	5.795 ± 2.206	198.26 ± 11.12	34724.17 ± 45184.58	786.72 ± 348.12	66.65 ± 18.05	313.23 ± 44.50	281.00 ± 46.54	0.419 ± 0.348	15.853 ± 0.945
Mean WL-CD group (n=17)	27.44 ± 3.40	0.0249 ± 0.0076	0.0294 ± 0.0097	0.0127 ± 0.0076	0.0680 ± 0.0237	0.0107 ± 0.0111	0.0051 ± 0.0005	0.0049 ± 0.0016	0.0350 ± 0.0043	3.114 ± 0.957	150.34 ± 23.43	21582.11 ± 3809.27	189.77 ± 80.06	7.79 ± 8.51	403.48 ± 49.23	149.63 ± 97.80	0.497 ± 0.345	14.445 ± 3.976
Mean WL-CD Individuals (n=6)	27.21 ± 1.99	0.0233 ± 0.0045	0.0275 ± 0.0042	0.0115 ± 0.0010	0.0647 ± 0.0068	0.0108 ± 0.0004	0.0051 ± 0.0004	0.0045 ± 0.0008	0.0358 ± 0.0009	3.379 ± 0.562	149.50 ± 15.19	21465.00 ± 1585.89	154.32 ± 65.86	5.60 ± 2.89	412.31 ± 28.63	206.00 ± 106.62	0.531 ± 0.456	15.981 ± 1.553
Mean WL-HFD group (n=19)	41.31 ± 3.92	0.0658 ± 0.0099	0.0632 ± 0.0135	0.0308 ± 0.0062	0.1598 ± 0.0150	0.0083 ± 0.0006	0.0037 ± 0.0003	0.0057 ± 0.0024	0.0306 ± 0.0047	5.616 ± 1.337	185.89 ± 18.47	35228.6 ± 8740.67	572.70 ± 244.40	60.34 ± 23.86	326.89 ± 38.32	229.53 ± 101.53	0.423 ± 0.260	13.338 ± 4.243
Mean WL-HFD Individuals (n=6)	41.91 ± 4.06	0.0666 ± 0.0097	0.0672 ± 0.0150	0.0335 ± 0.0040	0.1674 ± 0.0124	0.0082 ± 0.0007	0.0036 ± 0.0004	0.0052 ± 0.0020	0.0297 ± 0.0014	5.725 ± 0.775	184.08 ± 11.91	31750.00 ± 2995.05	467.16 ± 173.20	58.00 ± 18.76	333.01 ± 37.40	245.17 ± 102.08	0.335 ± 0.276	NA

### **3) Décryptage des acteurs épigénétiques du conditionnement**

#### **3.1) Contexte**

Les travaux du projet TPMP ont permis de démontrer que l'obésité maternelle chronique provoquait une restriction de croissance fœtale et une insuffisance placentaire au terme de la gestation. La proportion des fœtus petits pour l'âge gestationnel (SGA) atteignait 28% chez les mères obèses (Panchenko et al. 2016). Dans le groupe perte de poids préconceptionnelle, le poids fœtal ainsi que la proportion des fœtus SGA étaient complètement normalisés. Une première approche moléculaire, pour expliquer les origines et les conséquences de la restriction de croissance induite par l'obésité maternelle, a été abordée dans ce modèle. L'expression de 60 gènes d'enzymes de la machinerie épigénétique et 32 gènes du métabolisme et de la croissance fœtale ont été analysés par RT-qPCR (transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative). De façon intéressante, dans le foie fœtal, les modificateurs épigénétiques étaient très sensibles à l'obésité maternelle et l'expression d'une partie de ces gènes a été restaurée par la perte de poids préconceptionnelle. Toutefois, l'expression de certains gènes est restée affectée par rapport au niveau observé dans le foie des fœtus de souris contrôles. Ces données montrent les effets bénéfiques de la perte de poids, après une obésité chez la mère, sur la croissance fœtale et sur l'expression génique. Cependant, les fœtus et les placentas issus des mères qui ont perdu du poids en période préconceptionnelle, présentaient une "adaptation" au niveau transcriptionnel. Ces résultats témoignent d'une "mémorisation" de l'histoire d'obésité des mères, ou d'un métabolisme maternel peut être encore altéré chez ces femelles, mis en évidence dans le phénotype de la descendance.

Cet article révélait que les gènes impliqués dans l'acétylation des histones étaient particulièrement sensibles à l'environnement métabolique et nutritionnel de la mère. Parmi les gènes dérégulés par l'obésité ou la perte de poids maternelle, les gènes codant pour des lysine acétyltransférases et des histone désacétylases représentaient une part importante (7 gènes sur les 18 différentiellement exprimés). D'une part, l'expression des lysines acétyltransférases, qui apposent le groupement acétyle sur les lysines, augmentait dans le groupe des mères obèses. D'autre part, la plupart des histones désacétylases, qui catalysent la réaction inverse, étaient réprimées. L'ensemble de ces altérations pourrait conduire à un niveau d'acétylation plus élevé dans le foie fœtal.



Activité	Histone 3	Total	K4	K9	K14	K18	K23	K27	K36	K37	K56
Reader/Writer	Kat2a			+	+						
Reader/Writer	Kat3a-CREBBP-CBP/P300					+		+			+
Writer	Kat6b	+									
Writer	Kat13d-CLOCK				+						
	Hdac2										
	Hdac6										
	Brd2										

Activité	Histone 4	Total	K5	K8	K12	K16	K20	K44	K91a c
Reader/Writer	Kat2a		+	+	+	+			+
Reader/Writer	Kat3a-CREBBP-CBP/P300		+	+	+	+			
Writer	Kat6b	+							
	Kat13d-CLOCK								
	Hdac2								
	Hdac6								
Reader	Brd2				+				

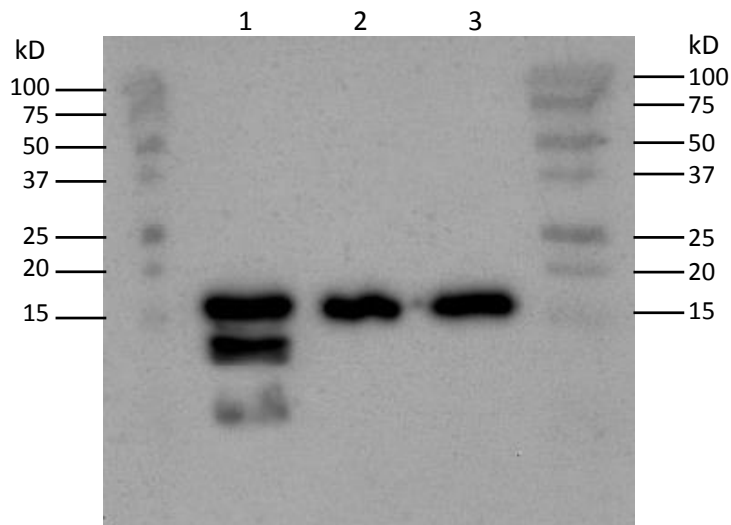
**Tableau 5. Enzymes de la machinerie épigénétique différenciellement exprimées dans le foie fœtal et modifications post traductionnelles des histones H3 et H4 qui y sont associées**

Données issues du site [www.atrec.org/histome/](http://www.atrec.org/histome/)

Adapté de Khare et al. 2011

### 3.2) Sélection de la marque d’histone, pour l’analyse épigénétique

Ces informations nous ont convaincu qu’une analyse épigénomique des marques d’acétylation des histones était nécessaire, afin d’identifier les régions génomiques cibles des modifications de la voie d’acétylation des histones. Dans notre modèle, les enzymes différenciellement exprimées dans le foie fœtal étaient associées à l’acétylation de plusieurs lysines des histones H3 et H4. Sur ces seules histones H3 et H4, les lysines pouvant être acétylées sont au nombre de 16 (**Tableau 5**). Par conséquent, il était impossible de réaliser les analyses épigénomiques en immunoprécipitant ces 16 marques (peu pertinent, trop onéreux et pas assez de matériel biologique). Nous avons restreint ces analyses à une seule marque d’acétylation des histones. La première étape a été d’identifier « la » marque la plus cohérente à analyser. Pour cela, nous avons exploré la base de données Histome (<http://www.actrec.gov.in/histome/>) (Khare et al. 2012), qui réunit des informations concernant les enzymes de la machinerie épigénétique et les modifications post-traductionnelles des histones qui leur sont associées. Dans notre modèle, les enzymes différenciellement exprimées dans le foie fœtal étaient associées à l’acétylation de plusieurs lysines des histones H3 et H4. Il est apparu que les cibles potentielles de ces enzymes étaient plus nombreuses sur l’histone H4 (**Tableau 5**). De plus, parmi les deux lecteurs (*readers*) de la chromatine que nous avons étudiés (*Brd2* et *Brd8*), l’expression hépatique de *Brd2* chez le fœtus présentait un effet de programmation par l’obésité maternelle préconceptionnelle. Il était surexprimé dans les groupes OB et WL (Panchenko et al. 2016). De plus, ce lecteur agit principalement au niveau de l’histone H4 (**Tableau 5**). Enfin, peu de données de la littérature rapportent des résultats d’analyses épigénomiques concernant l’histone H4 chez la souris au stade fœtal. Pour ces raisons, nous avons décidé de centrer nos recherches sur l’acétylation de l’histone H4, et en particulier sur les marques H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac et H4K16ac. De plus, comme des modifications de l’acétylation de la lysine 27 de l’histone H3 ont été identifiées le placenta de fœtus présentant une restriction de croissance, nous avons également utilisé H3 (Paauw et al. 2018). Le signal H3 nous a également servi à la normalisation des signaux H4. Afin de déterminer laquelle pourrait être la plus pertinente à étudier en ChIP-Seq, nous avons tout d’abord voulu réaliser des quantifications par la méthode de western blot, qui avait été utilisée précédemment au laboratoire (Anne Gabory et al. 2012).



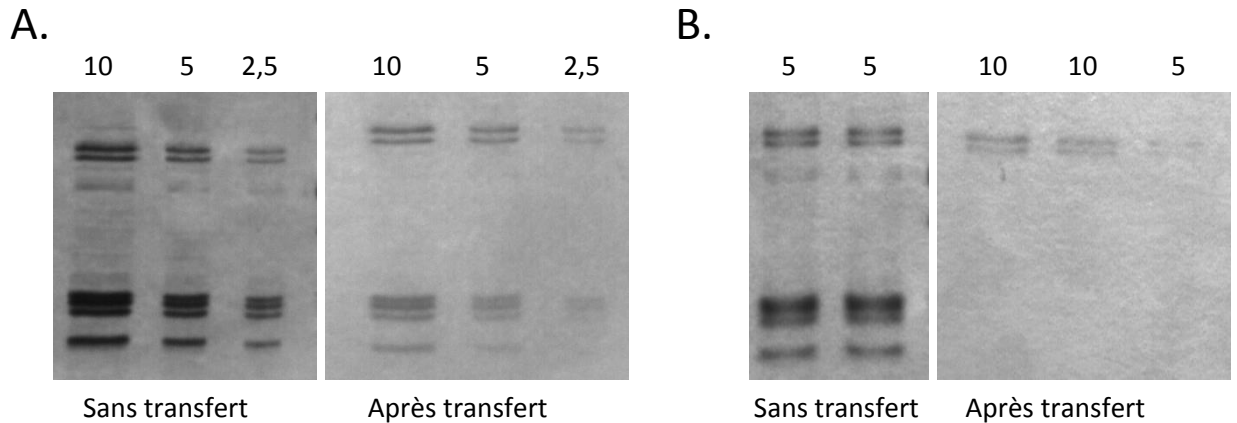
**Figure 45. Comparaison des méthodes d'extraction et de purification des histones**

Western blot anti H3 total

Echantillon 1 extrait par le kit extraction d'histones EpiQuick™

Echantillons 2 et 3 extraits par le protocole adapté de Shechter et al. 2007

Marqueur de taille : Precision Plus Protein™ Standards ; kD – kiloDalton



**Figure 46. Comparaison de l'efficacité de transfert entre le système humide (A) et semi-sec (B).**

L'intensité de la coloration au bleu de Coomassie est moins intense dans le gel après transfert semi-sec, ce qui montre une meilleure efficacité de transfert. La quantité de protéines déposée dans chaque puit est indiquée au dessus (en µg de protéines).

### **Sélection des fœtus pour le western blot**

La tissuthèque du modèle TPMP est composée d'un total de 180 fœtus, provenant de 23 portées, comprenant chacune entre 6 et 9 fœtus. Dans une portée de souriceaux, la capacité de transfert des nutriments par le placenta est différente entre le plus grand et le plus petit placenta. De plus, ces différences sont associées à la croissance fœtale : les plus petits placentas sont associés aux plus petits fœtus, et les plus grands placentas aux plus grands fœtus (Coan et al. 2008). Or, dans le contexte de la DOHaD, ce paramètre est important à prendre en compte. Nous avons donc décidé d'exclure de cette sélection le plus grand et le plus petit fœtus de chaque portée, lorsque cela était possible. Nous avons sélectionné, par tirage au sort, un fœtus de chaque sexe parmi ceux restant dans chaque portée, lorsque c'était possible pour les analyses par Western blot (**annexe Tableau VII**). En revanche, l'optimisation des conditions du western blot (extraction des échantillons, conditions de transfert et d'hybridation) a été réalisée à l'aide d'un échantillon de foie fœtal ne faisant pas partie des portées étudiées.

#### **3.2.1) Optimisation du protocole de western blot**

##### **Méthode d'extraction et purification des histones**

Nous avons en premier lieu choisi d'utiliser un kit d'extraction et de purification commercialisé par la société EpiGentek (EpiQuik™ Total Histone Extraction Kit). Néanmoins, en analysant les extraits ainsi obtenus, nous nous sommes rendu compte de la présence de plusieurs bandes correspondant à l'histone H3 (**Figure 45**). Ces bandes multiples provenaient sûrement d'une lyse des queues d'histone (Howe et Gamble 2015). Dans la littérature, le protocole d'extraction le plus cité est celui de Shechter et associés (Shechter et al. 2007). Ce protocole utilise des inhibiteurs de protéases, permettant de limiter la lyse de H3, mais il est optimisé pour les cellules en culture. Nos échantillons étant des foies fœtaux, il nous a fallu procéder à une adaptation de ce protocole. Nous avons testé différentes conditions d'extraction des histones (volume de tampon de lyse, conditions d'isolation des noyaux, conditions de précipitation des protéines, conditions de re-suspension des protéines). Le protocole mis au point pour nos échantillons de foie fœtal est présenté en annexe (**Protocole III**).

**H3.1**                    10                    20                    30                    40                    50  
MARTKQTARK STGGKAPRKQ LATKAARKSA PATGGVKKPH RYRPGTVALR  
                          60                    70                    80                    90                    100  
EIRRYQKSTE LLIRKLPFQR LVREIAQDFK TDLRFQSSAV **MALQEACEAY**  
                          110                    120                    130  
LVGLFEDTNL CAIHAKRVTI MPKDIQLARR IRGERA

**H3.2**                    10                    20                    30                    40                    50  
MARTKQTARK STGGKAPRKQ LATKAARKSA PATGGVKKPH RYRPGTVALR  
                          60                    70                    80                    90                    100  
EIRRYQKSTE LLIRKLPFQR LVREIAQDFK TDLRFQSSAV **MALQEASEAY**  
                          110                    120                    130  
LVGLFEDTNL CAIHAKRVTI MPKDIQLARR IRGERA

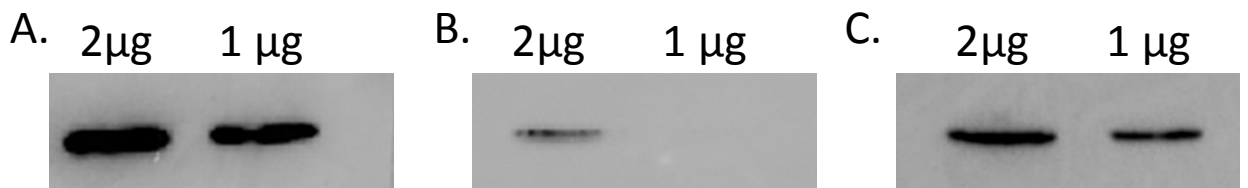
**H3.3**                    10                    20                    30                    40                    50  
MARTKQTARK STGGKAPRKQ LATKAARKSA PSTGGVKKPH RYRPGTVALR  
                          60                    70                    80                    90                    100  
EIRRYQKSTE LLIRKLPFQR LVREIAQDFK TDLRFQSAAI **GALQEASEAY**  
                          110                    120                    130  
LVGLFEDTNL CAIHAKRVTI MPKDIQLARR IRGERA

**H4**                            10                    20                    30                    40                    50  
MSGRGKGGKG LGKGGAKRHR KVLRDNIQGI TKPAIRRLAR RGGVKRISGL  
                          60                    70                    80                    90                    100  
IYEETRGLVK VFLENVIRDA VTYTEHAKRK TVTAMDVVYA LKRQGRTRYG  
  
FGG

**Figure 47. Séquences des histones H3 et H4 de la souris**

Les séquences des variants de l’histone H3 et la séquence de l’histone H4 sont présentées en utilisant la nomenclature à une lettre des acides aminés. Les acides aminés qui diffèrent dans les variants d’H3 sont indiqués en gras.

Informations recueillies dans la base de données UniProt



**Figure 48. Comparaison de l’efficacité des méthodes de décapage des membranes de western blot**

Dépôts de 2 µg et 1 µg d’histones purifiés à partir du même échantillon ;

Dilution de l’anticorps anti H4 total : 1/100 ; Dilution de l’anticorps anti IgG de lapin : 1/10000

A. Western blot anti H4 total avant décapage

B. Western blot anti H4 total après décapage par une solution contenant du β-mercaptoéthanol, incubé 30 minutes à 54°C, sans agitation

C. Western blot anti H4 total après décapage par une solution concentrée en SDS, incubé 30 minutes à température ambiante, sous agitation

## Conditions de transfert pour le western blot

Nous avons testé deux méthodes de transfert des protéines sur membrane de PVDF : la méthode classique de transfert humide et la méthode de transfert semi-sec de Bio-Rad. Afin d'évaluer l'efficacité de chacune de ces méthodes, nous avons comparé la quantité de protéines restant dans le gel après transfert, ainsi que l'intensité du signal H3 total détecté sur les membranes. A l'issue de ces comparaisons il nous est apparu évident que la méthode de transfert semi-sec était plus efficace, mais aussi beaucoup plus rapide que la méthode de transfert classique (**Figure 46**). Nous avons donc décidé de poursuivre en utilisant la méthode de transfert semi-sec.

Nous pensions utiliser une nouvelle technologie de détection protéique, développée par la société Bio-Rad, la technologie Stain-Free. Cette technologie est basée sur l'utilisation d'un composé se fixant aux tryptophanes présents dans les protéines, permettant ainsi d'estimer la quantité totale de protéines déposées ainsi que la normalisation du signal de western blot. Or, cette technologie ne fonctionnait pas sur nos échantillons. De fait, les histones ne contiennent pas de tryptophane (code à une lettre : W) (**Figure 47**). Nous avons donc utilisé un protocole de western blot classique en utilisant des gels pré-coulés, présenté en annexe (**Protocole IV**).

Afin de normaliser les signaux, il nous était nécessaire de quantifier les signaux des histones H3 et H4 totaux en plus des marques spécifique d'acétylation des histones. Pour cela, l'utilisation d'une méthode de décapage des membranes (*stripping*) est nécessaire, afin d'éliminer les anticorps primaires et secondaires qui ont été utilisés pour la détection des modifications post-traductionnelles des histones, avant de réhybrider la membrane pour normalisation par les histones totaux. Nous avons testé deux méthodes de *stripping* classiquement utilisées : une méthode utilisant du  $\beta$ -Mercaptoéthanol, avec une température d'incubation de 56°C et une méthode concentrée en SDS, avec une incubation à température ambiante. A l'issue de ces tests nous avons décidé d'utiliser la méthode concentrée en SDS qui préserve mieux les protéines transférées sur la membrane (**Figure 48**).

Enfin, nous avons testé plusieurs anticorps dirigés contre l'acétylation des lysines en position 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 et de la lysine en position 27 de l'histone H3. Les différents anticorps testés ainsi que leurs conditions d'utilisation sont présentés dans le **tableau 6**.

Les différentes étapes d'optimisation du western blot ont permis de réduire par 4 la quantité de protéines à analyser, passant de 2 $\mu$ g à 0,5 $\mu$ g.

Marque ciblée	Fournisseur	Référence	Conditions de dilution	
			Anticorps primaire	Anticorps secondaire
H4K5ac	Santa Cruz	sc-8659	Non validé	
	Active Motif	39584	1/12000	1/25000
H4K8ac	Active Motif	39171	Non validé	
	Active Motif	61103	Non validé	
H4K12ac	Active Motif	39166	1/20000	1/25000
H4K16ac	Abcam	ab61240	Non validé	
	Abcam	ab109463	1/2000	1/25000
H4 total	Abcam	ab10158	Non validé	
	Millipore	#07-108	1/500	1/10000
H3K27ac	Active Motif	39134	Non validé	
	Abcam	ab45173	1/2000	1/25000
H3 total	Abcam	ab1791	1/30000	1/25000

Tableau 6. Liste des anticorps testés et de leur condition d'utilisation

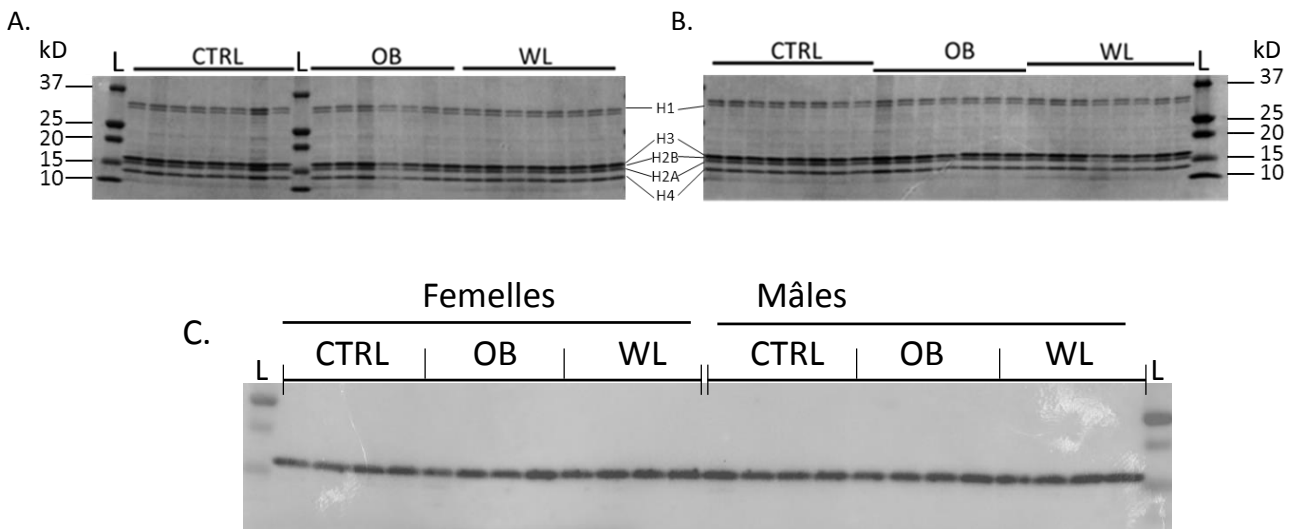


Figure 49. Vérification de l'intégrité des extraits d'histone des foies fœtaux du modèle TPMP

Coloration au bleu de Coomassie des protéines extraites des foies fœtaux de souris femelles (A) et mâles (B). Western blot dirigé contre l'histone H3 total, réalisé sur 0,5µg de chaque pool d'extrait d'histones des foies fœtaux des souris femelles et mâles (C).

kD – kilo Dalton ; L – marqueur de taille ; CTRL – descendants de mères sous régime contrôle ; OB – descendants de mères sous régime hyperlipidique ; WL – descendants de mères du groupe perte de poids

### 3.2.2) Résultats des western blots

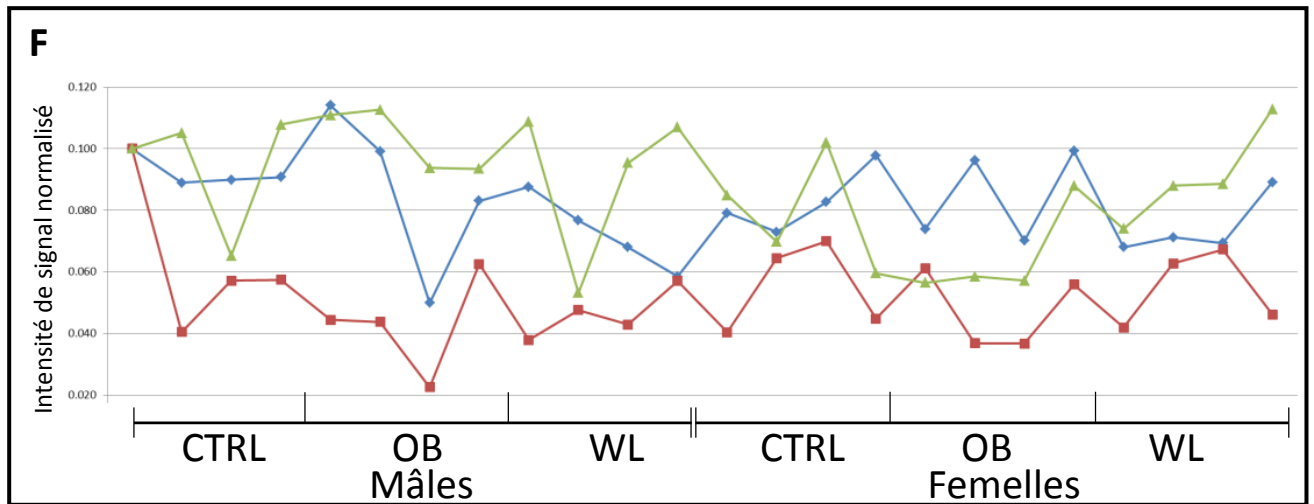
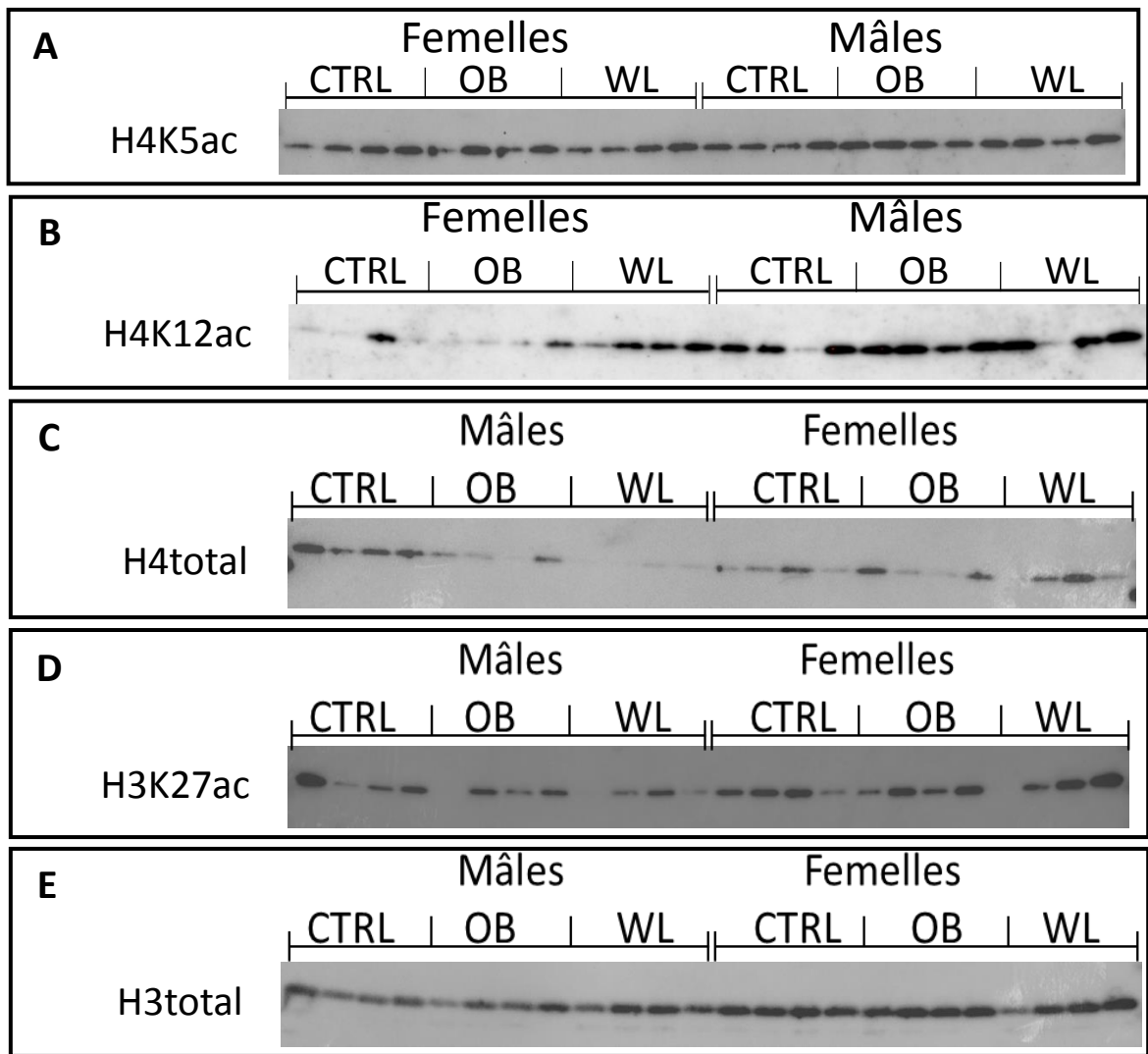
Il a été décidé d'analyser tous les individus sur la même membrane afin de réduire les variations entre les mesures et ainsi faciliter les comparaisons entre chaque groupe. Nous avons donc choisi d'utiliser des gels comportant 26 puits pour les migrations et des membranes adaptées aux dimensions de ces gels, pour la suite du protocole de western blot. Après vérification de l'intégrité des histones extraits par une coloration des gels de migration au bleu de Coomassie (**Figure 49A et B**), nous avons regroupé, ou poolé, par deux les extraits d'histones des individus de même sexe de chaque groupe maternel, ramenant le nombre de dépôts à 4 par groupe maternel pour chaque sexe. Nous avons ensuite hybridé la membrane avec l'anticorps anti H3 afin de vérifier de nouveau l'intégrité des histones et évaluer si les pools avaient une concentration homogène (**Figure 49 C**).

Les signaux H3 total et H4 total sont censés être stables entre les échantillons, pour une même quantité de protéines déposée, ce qui n'était pas le cas (**Figure 50**). De plus, les signaux détectés pour les marques d'acétylation de l'histone H4 et H3, montrent des variations intra groupe. (**Figure 50 A, B et D**). La normalisation de ces signaux par H4 Total (**Figure 50 C**) ou H3 Total (**Figure 50 E**) a été compliquée par des variations importantes de signaux entre échantillons. Une analyse poussée comparant les signaux H3 Total acquis sur des blots différents a confirmé la labilité des marquages, rendant impossible la normalisation des signaux des marques d'acétylation (**Figure 50 F**). Cette labilité diminuait la fiabilité de ces western blots, ce qui aurait pu fausser notre interprétation des résultats.

Compte-tenu de toutes ces observations, nous avons donc décidé de ne pas poursuivre l'analyse par Western blot. L'ensemble de ces optimisations ayant pris beaucoup de temps et compte-tenu de l'avancée des analyses métabolomiques, l'étude par CHIP-Seq n'a pas pu être réalisée au cours de cette thèse.

L'aspect méthodologique et l'intérêt de l'analyse épigénomique sera discuté dans la troisième partie de la Discussion de ce manuscrit de thèse.





**Figure 50.** Exemple illustratif de western blots dirigés contre les marques H4K5ac (A), H4K12ac (B), H4 Total (C), H3K27ac (D) et H3 Total (E) sur les échantillons de foies fœtaux du modèle TPMP

Pour ces western blots, 0,5µg de protéines extraites de foies fœtaux ont été analysés, selon les conditions d'incubation détaillées dans le tableau 6. L'ordre des dépôts est différent d'une membrane à une autre, afin d'éviter les effets de bords pouvant perturber l'acquisition des signaux pour chacune des marques analysées. Le graphique (F) représente l'intensité du signal H3 Total, rapporté à l'intensité du premier pool CTRL, pour trois membranes différentes. Ces membranes ont été préalablement hybridées contre H4K12ac et H4 Total.

# **DISCUSSION**

# Discussion

## 1) Phénotype et métabolisme

### 1.1) Originalités et limites

Ces travaux présentent un apport d'information inédit à la littérature, en particulier concernant les tissus cérébraux. En effet, aucune étude métabolomique n'avait été réalisée à ce jour sur l'hypothalamus et le bulbe olfactif dans le contexte de la DOHaD, en lien avec l'obésité maternelle. Les quelques études réalisées dans le contexte de la DOHaD, concernent les effets hypothalamiques, à l'âge adulte, de la restriction de croissance intra-utérine (Pedroso et al. 2017; 2018). Des études se sont aussi intéressées aux effets à long terme de la restriction de croissance intra-utérine sur la descendance en analysant le plasma de ces individus (Alexandre-Gouabau et al. 2011; Dellschaft et al. 2015).

« Le métabolome représente l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou toute cause environnementale (Ezan et al. 2010). Le métabolome d'un système peut ainsi, à la fois permettre de lire la signature biologique d'une réponse adaptative ou pathologique, et également être le vecteur de cette réponse. Ce dernier aspect souligne l'implication directe du métabolome dans le déterminisme des phénotypes ».

Concernant les effets des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles sur le métabolisme des descendants, notre étude est la seule à en évaluer les effets à long terme, en utilisant une méthode d'analyse holistique (Chao De La Barca et al. 2015). Dans ce contexte, mais à court terme, l'étude de Wesolowski et collaborateurs, présente des résultats d'analyse métabolomique dirigée, dans le foie fœtal chez le macaque (Wesolowski et al. 2018).

#### 1.1.1) Modèle expérimental

Le modèle animal utilisé dans cette étude comporte certaines limites :

- Tout d'abord, la souche de souris C57BL/6J a été choisie pour sa sensibilité à l'obésité, ce qui a conduit à l'obtention de mères, puis de descendants, obèses bien caractérisés sur le plan métabolique. Les souris C57BL6/J, sont très prisées pour les études DIO (pour *Diet-Induced Obesity*) puisqu'elles développent un phénotype similaire au syndrome métabolique humain lorsqu'elles sont nourries avec un régime HFD (obésité, hyperinsulinémie, insulino-résistance) et constituent également, comme dans la majorité des

cas d'obésité observés chez l'être humain, des modèles d'obésité qui ne sont pas purement dépendant du système leptinergique mais d'origine plurifactorielle (Collins et al. 2004). En revanche, comme différentes souches de souris répondent différemment aux régimes gras HFD proposés cela peut expliquer que nos résultats ne soient pas toujours transposables à d'autres études faites sur d'autres souches de souris ou d'autres espèces animales pour lesquelles le syndrome métabolique peut être moins marqué (Ribaroff et al. 2017).

- Le régime auquel ont été soumises les souris était composé à 60% de lipides (lard), ce qui est élevé au regard d'autres régimes souvent utilisés (autour de 40% de lipides) (**Tableaux 1 et références du Tableau 4**). Néanmoins, un pourcentage important d'animaux s'avèrent être résistants à la DIO (~20% pour un HFD 60%) (Gallou-Kabani et al. 2007). Ce pourcentage augmente lorsque le pourcentage de lipides dans le régime diminue, ce qui nécessite d'augmenter les effectifs d'animaux dans les protocoles expérimentaux. Pour des questions éthiques (réduction du nombre d'animaux à utiliser), il est donc préférable d'avoir recours à un régime HFD à 60% de lipides. D'autre part, la présence modérée d'hydrates de carbone ou glucides, à hauteur de 20% dans le régime HFD (saccharose) contre 70% dans le régime contrôle (apportés principalement sous la forme complexe d'amidon), n'est pas représentatif des régimes « cafétéria », qui entraînent des troubles métaboliques plus importants chez la souris (Higa et al. 2014). Par exemple, un régime riche en lipides et en glucides aurait été plus représentatif du régime obésogène habituellement rencontré chez l'être humain. Néanmoins, l'ensemble de ces modèles de régimes obésogènes, par la variété des résultats qu'elles apportent, représentent bien les variations naturelles des diètes humaines.

- Dans notre modèle, l'obésité a été induite par une alimentation hyperlipidique et la perte de poids par une transition sur un régime contrôle. Or, cette transition alimentaire a été réalisée de manière abrupte (du jour au lendemain), ce qui pourrait avoir stressé la mère et entraîner des répercussions sur le phénotype de la descendance (S. Zhang et al. 2013; Taouk et Schulkin 2016). Les effets observés chez les descendants WL pourraient donc provenir de la diminution des apports caloriques associés à la transition alimentaire, ou bien du stress maternel induit par le changement de régime alimentaire *per se*.

- Notre étude s'intéresse aux effets du métabolisme maternel préconceptionnel sur la descendance. Or, l'effet de la lactation en tant que tel n'a pas été étudié et pourrait constituer un facteur confondant. Afin de séparer les effets de l'environnement *in utero* des effets liés à la lactation, il aurait pu être envisagé de mettre en place un protocole d'adoption croisée des

portées. Cependant, l'adoption *per se* peut aussi être une source de variations phénotypiques (Matthews et al. 2011; McCarty 2017).

- Les conditions d'élevage de nos souris ne représentent pas non plus l'environnement « naturel » des animaux, les cages dans lesquelles ont été placées les souris favorisent l'inactivité physique en raison de leur taille et du manque « d'enrichissement » de leur milieu, sur le plan de l'exercice physique, mais pas au sens éthique du terme. Cependant, cet environnement correspond à la sédentarité généralement observée chez l'être humain, en situation d'obésité.

### **1.1.2) Approche utilisée**

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à trois tissus sur le même modèle animal, ce qui permet d'établir des liens entre ces trois acteurs de la régulation de l'homéostasie énergétique. De manière intéressante, le nombre important de métabolites détectés dans ces trois tissus est du même ordre de grandeur, de même que les classes de métabolites représentées, ce qui permet d'exclure un biais technique *a priori*. Le métabolome de chacun de ces tissus est donc comparable.

Cette étude métabolomique comporte certaines limites liées à la méthode que nous avons choisie pour l'analyse des tissus et l'exploitation des données générées. Nous l'avons effectuée sur le foie, l'hypothalamus et le bulbe olfactif, trois tissus à l'organisation cellulaire très complexe. Or, le métabolisme peut être différent en fonction du type cellulaire. Sur le plan technique, des analyses métabolomiques, sont difficiles à réaliser dans des populations cellulaires distinctes, que ce soit sur des tissus ou des fluides biologiques. La mise en place de protocoles de tri cellulaire pourrait permettre d'analyser le métabolome de certaines populations cellulaires spécifiques, comme les hépatocytes ou les neurones. Des techniques de microdissection pourraient aussi être envisageables afin d'isoler, par exemple, les noyaux hypothalamiques et étudier leur métabolome respectif. Plusieurs approches peuvent être utilisées pour réaliser des études métabolomiques. Les mesures par résonance magnétique nucléaire (RMN) permettent l'obtention de données précises concernant l'identité des métabolites tout en préservant les tissus pour des analyses en aval. Cependant, la RMN n'est pas très sensible, ce qui rend son utilisation complexe pour détecter des métabolites présents en faible quantité dans un échantillon. La GC-MS est une autre approche relativement semblable à la LC-MS mais dans laquelle les composés sont séparés en phase gazeuse, ce qui limite la détection des composés polaires et limite la taille des composés pouvant être détectés (Sébédio et Pujos-Guillot 2009).

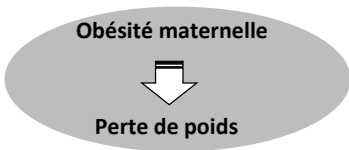
Comme pour toute analyse « omique », un traitement bioinformatique des données doit être réalisé pour apporter le meilleur équilibre possible entre faux-positifs et faux-négatifs. Les outils bioinformatiques ont également été choisis pour limiter le nombre de données inexploitable :

- L'analyse non dirigée des métabolites nécessite l'utilisation d'outils statistiques afin de limiter le risque de faux positif (p-value ajustée par la méthode FDR à 5%). Ceci peut avoir pour conséquence d'accroître le nombre de faux-négatifs. Plusieurs études se basent sur des statistiques moins strictes (valeurs de p brutes à 10% par exemple) et nous avons préféré faire un choix de statistiques strictes, qui a probablement impacté la dimension des analyses bioinformatiques en aval. Néanmoins, celles-ci sont basées sur des données qui nous paraissent plus fiables.

- Dans les résultats bruts fournis par Profilomic, l'identité putative associée à certains métabolites pouvait être multiple. Ceci était le cas de 70 métabolites dans le foie, 45 dans l'hypothalamus et 68 dans le bulbe olfactif, avec 2 à 7 annotations possibles. Pour les analyses d'enrichissement et de *pathways*, nous avons choisi d'exclure ces métabolites, car leur identité putative était incertaine. De plus, certains des métabolites ont été détectés plusieurs fois. Cela peut être dû à une détection dans les deux modes d'ionisation utilisés au cours de l'analyse LC-HRMS, mais aussi à une détection plusieurs fois dans le même mode. Sur les conseils de spécialistes de la métabolomique (Alexandre Seyer - MedDay Pharmaceuticals et Etienne Thevenot – CEA, LIST, Laboratory for data sciences and decision), nous avons décidé de conserver le métabolite ayant la plus forte intensité détectée pour les analyses d'enrichissement. Ceci afin de limiter les risques que l'intensité du signal soit trop faible pour détecter d'éventuelles différences entre les groupes. Enfin, certains des métabolites détectés n'ont pas pu être utilisés pour les analyses d'enrichissement et de *pathways* étant donné qu'aucun identifiant utilisé par MetaboAnalyst n'y était associé. C'était notamment le cas de l'ADP-ribose cyclique.

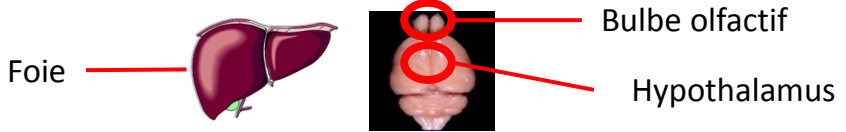
Le fait de ne pas prendre en compte ces métabolites, même si cela permet d'avoir des données plus robustes, entraîne aussi une augmentation du nombre de faux-négatifs. Cela est en partie dû au fait que les méthodes de traitement des données de métabolomique sont encore récentes et qu'il s'agit d'un domaine en plein développement (Chao De La Barca et al. 2015). Les bases de données utilisables sont aussi souvent incomplètes et parfois difficiles à compléter soi-même. De plus les outils d'analyse bioinformatique sont eux aussi encore en développement. Néanmoins, des consensus sont en train de se mettre en place quant aux bonnes pratiques à adopter pour ce type d'analyse, à l'initiative de groupes de chercheurs,

**Période préconceptionnelle**



**A l'âge adulte**  
**Programmation métabolique?**

6 mâles CD et 6 mâles HFD de chacun des trois groupes maternels



**Analyses en spectrométrie de masse (LC-HRMS)**  
et  
**Annotation des métabolites**



**Analyses statistiques**



		FOIE	HYPOTHALAMUS	BULBE OLFACTIF
Métabolites		278	200	258
Analyses descriptives (PLS-DA)		Impact global du régime post-sevrage	Impact global du régime post-sevrage	
Analyses différentielles (ANOVA à 2 facteurs, FDR<0,05)	Métabolites impactés par le régime HFD	108	16	11
	Intéraction entre le régime post-sevrage et le groupe maternel	1	0	0
	Métabolites impactés par le groupe maternel	1	0	0



**Analyses bioinformatiques**



**Identification des voies métaboliques impactées par le régime HFD dans chacun des trois tissus**

Figure 51 Résumé graphique de l'étude métabolomique du projet TPMP

ingénieurs et acteurs du monde de la métabolomique, tel que MetaboHUB (<https://www.metabohub.fr/>). Le développement d'outils, tels que ceux proposés par la plateforme d'analyse biostatistique et bioinformatique Workflow4Metabolomics (<https://workflow4metabolomics.org/>), sont des avancées précieuses afin de faciliter et d'optimiser les études métabolomiques, tout en unifiant les méthodes de traitement des résultats de telles études. Un résumé graphique de notre étude métabolomique est présenté en **Figure 51**.

## 1.2) Effet majeur du régime post-sevrage

Dans notre modèle, chez les descendants mâles, la consommation d'un régime hyperlipidique a entraîné le développement d'une obésité, associée à une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et une hyperleptinémie. De plus, les descendants mâles de mères obèses présentent une aggravation du phénotype d'obésité. Les effets à long terme sur le métabolome hépatique sont assez importants, tandis que les effets sur les tissus nerveux centraux (hypothalamus et bulbe olfactif) sont assez modestes, en termes de nombre de voies métaboliques affectées et sur l'impact des métabolites concernés dans chaque voie. Cependant, la comparaison entre les profils métaboliques permet de mettre en évidence des voies communes que nous allons discuter ci-après. Peu d'études ont comparé les profils métabolomiques des tissus périphériques et nerveux, l'essentiel des données portant sur des fluides biologiques (urine, sang de cordon ombilical) ou sur des corrélations avec des données de métagénomique fécale. Parmi elles, une étude métabolomique dirigée contre les médiateurs lipidiques chez la souris, a montré que la consommation d'un régime HFD a un impact bien plus important sur le métabolome hépatique que sur le métabolome hypothalamique (Hernandez-Carretero et al. 2017).

Il est tout de même important de savoir que le sang présent dans les organes analysés n'a pas été purgé au moment du sacrifice des animaux. Cela a pu entraîner la présence de métabolites spécifiques au sang dans notre analyse. Si tel est le cas, ces métabolites participent tout de même au cliché métabolique que nous souhaitons caractériser chez les descendants mâles à l'âge adulte. De plus, il est à noter que les animaux étaient à jeun au moment du sacrifice.

L'étude d'un métabolite, et de ses relations avec d'autres métabolites partageant la même voie, n'est pas suffisante pour comprendre le métabolisme d'un tissu. L'abondance d'un métabolite peut influencer sur un ensemble de métabolites et cet ensemble peut être en



interconnexion avec d'autres ensembles de métabolites (Choi et al. 2018). L'étude de l'ensemble des voies métaboliques impactées permet l'obtention d'une image globale de l'impact du régime post-sevrage sur chacun des tissus. Il est néanmoins nécessaire d'explorer ces analyses de *pathways* afin d'identifier si un ou plusieurs métabolites peuvent biaiser ces résultats. C'était le cas de l'ADP, augmenté dans le foie des animaux sous régime HFD. Quand il était inclus dans les analyses, cela entraînait l'identification de plusieurs voies métaboliques dans lesquelles l'ADP était central (métabolite « hub ») ou seul métabolite impacté. Nous avons donc choisi de l'exclure des analyses de *pathways*. Pour conclure, nous avons orienté notre discussion sur les voies métaboliques impactées par le régime HFD, plutôt qu'étudier chaque métabolite indépendamment.

L'un des résultats intéressants de notre étude est le fait que 3 des métabolites affectés par le régime post-sevrage étaient communs aux trois tissus étudiés. Ces métabolites sont l'anhydrosorbitol, la saccharopine et l'hydroxybutyrate avec une amplitude d'effet similaire dans les trois tissus, pour chacun d'eux. Une diminution significative de l'abondance d'anhydrosorbitol et de saccharopine a été observée sous HFD tandis que l'hydroxybutyrate était augmenté.

### **1.2.1) Le foie est très sensible au régime HFD, révélant sa plasticité métabolique**

L'analyse du métabolome hépatique, réalisé sur un échantillon représentatif des mâles de notre modèle (n=6/ groupe), a révélé un impact majeur du régime post-sevrage sur plusieurs métabolites associés au métabolisme des lipides, des glucides, des acides aminés. Ces résultats confirment l'impact global du régime HFD sur le métabolome hépatique, qui a été mis en évidence lors des analyses descriptives en PLS-DA.

Chez l'humain dans un contexte d'obésité, associée à une stéatose hépatique non-alcoolique et à un diabète, une étude métabolomique non dirigée a mis en évidence, dans le plasma, une dérégulation du métabolisme des acides aminés, des lipides, des glucides, de la voie de synthèse des acides biliaires et du glutathion (S. C. Kalhan et al. 2011). Des résultats similaires, bien que moins prononcés, ont été observés dans le plasma d'adolescents obèses présentant déjà une stéatose hépatique non-alcoolique. Il y a été constaté une dérégulation du métabolisme des lipides, des acides aminés et de la tyrosine (Jin et al. 2016). De manière intéressante, en cas de stéatohépatite, le métabolome plasmatique ne diffère pas de celui de patients présentant une stéatose hépatique non-alcoolique (S. C. Kalhan et al. 2011). En contexte d'obésité chez l'humain, le métabolome plasmatique présente une dérégulation du

métabolisme des lipides, des glucides et des acides aminés (Ahmad et al. 2017). Cependant, ces individus présentaient une altération des fonctions hépatiques, révélé par une augmentation plasmatique en alanine transaminase et  $\alpha$ -glutamyle transférase ainsi que par une diminution des taux de bilirubine et d'albumine. Il est donc possible que ces altérations du métabolome plasmatique soient dues à l'association de l'obésité et de dysfonctions hépatiques (Ahmad et al. 2017).

Les effets plasmatiques de l'obésité et de la stéatose hépatique ou de la stéatohépatite, chez l'être humain, sont donc assez semblables à ceux observés dans le foie des souris de notre modèle. De plus, une étude comparative du métabolome hépatique a été menée, entre des humains présentant une stéatohépatite et des rats chez lesquels une stéatohépatite a été induite par un déficit alimentaire en méthionine ou par un régime hyperlipidique (J. Han et al. 2017). Dans les deux cas, une dérégulation du métabolisme des acides aminés, des lipides et des acides biliaires a été constatée, bien que les métabolites concernés soient différents entre l'humain et le rat (J. Han et al. 2017). Il est donc possible que les mécanismes responsables de ces dérégulations soient proches chez l'être humain et les rongeurs.

Chez la souris, le métabolome hépatique présente une plasticité importante par comparaison avec ceux des tissus musculaires et adipeux. Un régime cétogène (84% de lipides) est celui ayant l'effet le plus important sur le foie, le tissu adipeux et le tissu musculaire (Wells et al. 2018). La signature métabolique hépatique d'un régime hyperlipidique (HFD) ou hyperlipidique et glucidique (HFS) est plutôt semblable et implique des métabolites associés au métabolisme des lipides et des glucides (Showalter et al. 2018). Une analyse intégrative de l'effet d'un régime HFD sur le foie a été conduite chez des souris mâles (Soltis et al. 2017). Chez ces souris, le régime HFD entraîne le développement d'une obésité, d'une résistance à l'insuline, d'une intolérance au glucose, d'une hyperglycémie et d'une stéatose hépatique. L'analyse de leur métabolome hépatique révèle une dérégulation du métabolisme glucidique, lipidique et des acides aminés. L'intégration des données, issues de l'analyse du métabolome, du protéome et des régulateurs de la transcription du foie de ces souris a été réalisée. Elle révèle que le régime HFD entraîne une dérégulation importante du métabolisme des acides aminés et du pyruvate, de l'oxydation des acides gras, de l'apoptose, de la transcription, de la matrice extracellulaire et du métabolisme des acides biliaires (Soltis et al. 2017).

Chez l'être humain et les modèles de rongeurs, les voies métaboliques altérées par un régime HFD, une obésité ou en cas de stéatose hépatique non alcoolique, sont assez semblables à celles impactées dans notre modèle. Ces voies sont nombreuses et impliquées

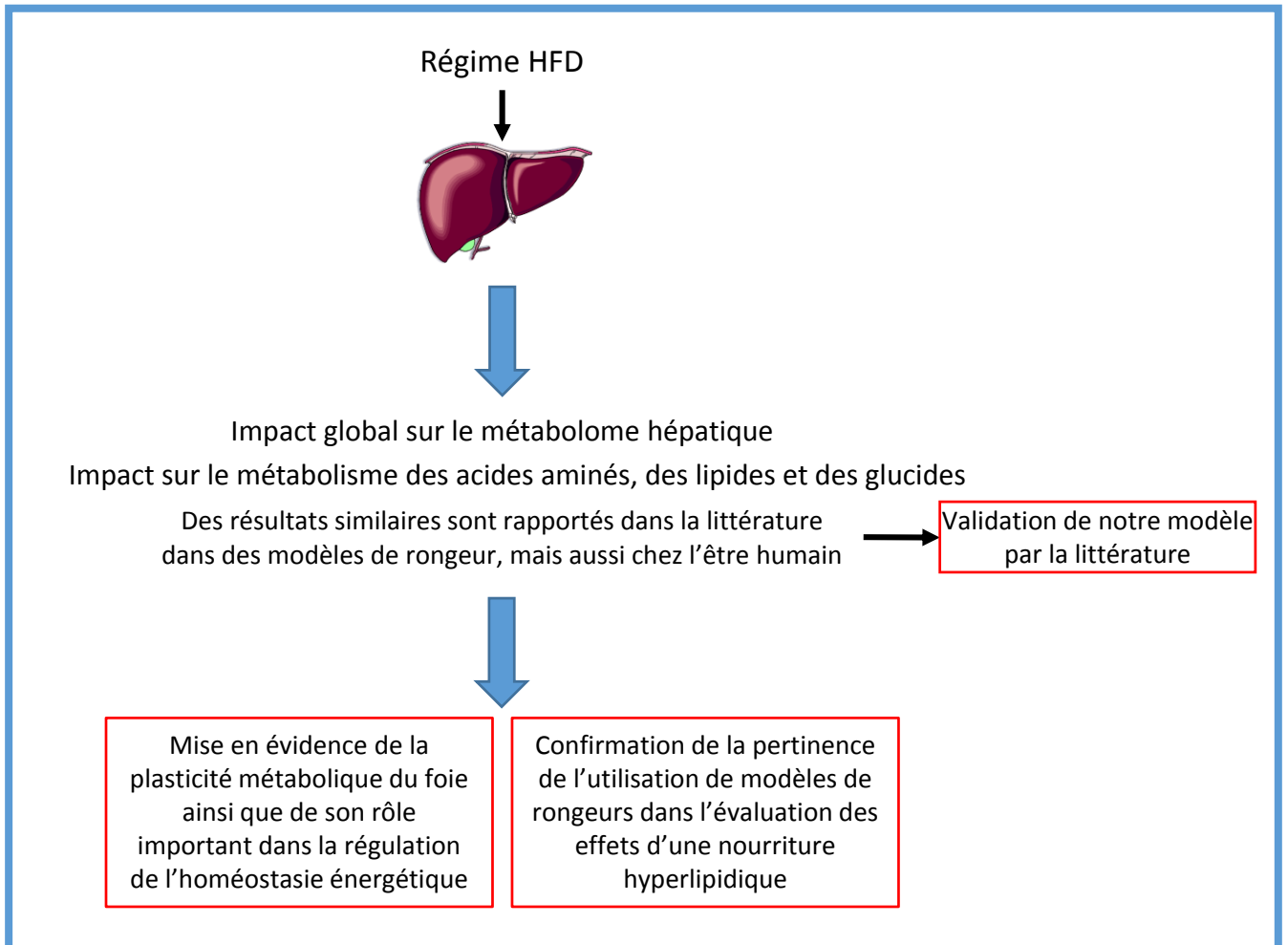


Figure 52. Résumé graphique des analyses des voies métaboliques impactées par le régime HFD post-sevrage dans le foie

dans le métabolisme des acides aminés, des glucides et des lipides. De plus, dans notre modèle, le régime HFD a aussi eu un impact sur le métabolisme des vitamines B, en particulier de la vitamine B6 (pyridoxamine 5'-phosphate) mais aussi sur la biosynthèse de la vitamine B5 (pantothénate). Ces composés sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés, mais aussi dans la néoglucogenèse (Chawla et Kvarnberg 2014). Ces résultats semblent indiquer que le régime HFD entraîne une mobilisation importante des acides aminés en association avec le métabolisme glucidique et lipidique afin de couvrir les besoins en énergie des animaux pendant une période de jeûne (6 heures avant sacrifice).

**Le foie présente une grande plasticité métabolique comparé à d'autres tissus de l'organisme (tissus adipeux, musculaire, cérébral). Cela révèle le rôle central du foie dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et confirme que l'utilisation de modèles de rongeurs est pertinente pour évaluer finement les effets d'une alimentation hyperlipidique et ouvrir des pistes de réflexion en ce qui concerne ces potentiels effets chez l'être humain.** Un résumé graphique de l'impact métabolique du régime HFD post-sevrage sur le foie est présenté en **Figure 52**.

### **1.2.2) Le régime HFD altère le métabolisme des acides aminés dans l'hypothalamus**

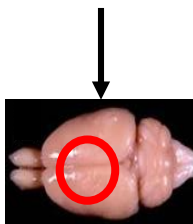
Dans notre modèle, le régime HFD a eu un impact sur le métabolisme de plusieurs acides aminés, sur le cycle de l'urée et le recyclage de l'ammoniac dans l'hypothalamus. Cet impact était moins vaste que dans le foie, mais il est tout de même important étant donné que l'impact global du régime HFD sur l'hypothalamus a été mis en évidence dans les analyses descriptives (PLS-DA).

La culture de cellules hypothalamiques, en présence d'une surabondance de lipides, entraîne une modulation de l'oxydation des acides gras et semble permettre ainsi une protection anti-inflammatoire (McFadden et al. 2014). Cela pourrait expliquer la faible quantité de métabolites (16) impactés par le régime HFD dans notre étude.

Une enzyme particulièrement intéressante, au regard des altérations hypothalamiques induites par le régime HFD dans notre modèle est l'aspartate aminotransférase mitochondriale (Got2). En effet cette enzyme joue un rôle essentiel dans le métabolisme de l'arginine et de la proline, le cycle de l'urée et est impliquée dans le métabolisme de l'aspartate (données KEGG).

La restriction de croissance intra-utérine, programme des modifications du métabolome hypothalamique, chez le rat adulte. Le nombre de métabolites dont l'abondance a été impactée est faible, à hauteur de 14 métabolites (Pedroso et al. 2017). En comparant les

Régime HFD



Impact global sur le métabolome hypothalamique

Impact sur le métabolisme des acides aminés, le cycle de l'urée et le recyclage de l'ammoniac

Semble indiquer une mobilisation accrue des acides aminés pendant une période de jeûne

Mise en évidence de la faible plasticité métabolique de l'hypothalamus

L'impact sur le métabolisme de la lysine pourrait être une cause des modifications du comportement alimentaire ou associées au régime alimentaire

Figure 53. Résumé graphique des analyses des voies métaboliques impactées par le régime HFD post-sevrage dans l'hypothalamus

individus CTRL-CD et OB-CD de notre modèle, ces altérations sont absentes. L'effet de la restriction de croissance intra-utérine semble donc différent en fonction de si elle a été causée par une restriction alimentaire ou par un régime HFD maternel.

#### *Effet sur le métabolisme des acides aminés*

Parmi les voies métaboliques impactées par le régime HFD dans l'hypothalamus, la voie de dégradation de la lysine se distingue, au travers de la diminution de la saccharopine. En effet, le métabolisme de la lysine est très important dans le fonctionnement cérébral, malgré le fait que sa voie de dégradation via la production de saccharopine soit réputée mineure dans le cerveau adulte, bien que cela ait été récemment controversé (Hallen, Jamie, et Cooper 2013; Crowther et al. 2019).

La diminution de la saccharopine chez les HFD suggère soit une moindre dégradation de la lysine, ou une augmentation de l'utilisation de la saccharopine et par conséquent de la dégradation de la lysine. De plus, la lysine est un acide aminé essentiel présent à forte concentration dans le cerveau, précurseur de la production *de novo* du glutamate dans les cellules neuronales (Papes et al. 2001). Une altération de son métabolisme pourrait entraîner des troubles de signalisation neuronale, ce qui pourrait entraîner des altérations du comportement alimentaire.

**Néanmoins, le fait que le cycle de l'urée et le recyclage de l'ammoniac soient impactés par le régime HFD, en plus de son impact sur le métabolisme des acides aminés, nous laisse supposer qu'en période de jeûne, l'hypothalamus à recours à l'utilisation des acides aminés afin de subvenir à ses besoins énergétiques. Une des possibilités serait que les astrocytes produisent des corps cétoniques, à partir des acides aminés, afin de les utiliser comme source d'énergie alternative.** Un résumé graphique de l'impact métabolique du régime HFD post-sevrage sur l'hypothalamus est présenté en **Figure 53**.

#### **1.2.3) Le bulbe olfactif est peu sensible au régime HFD post-sevrage**

Les analyses descriptives du bulbe olfactif n'ont pas mis en évidence d'effet global du régime post-sevrage. En revanche, les analyses différentielles ont mis en évidence un effet modeste du régime HFD sur le métabolome du bulbe olfactif, sur le métabolisme des acides aminés et des lipides. De manière intéressante, notre étude est la première à avoir analysé le métabolome du bulbe olfactif de manière non-dirigée.

### *Effet sur le métabolisme des acides aminés*

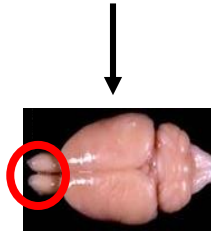
La voie de dégradation de la lysine est impactée dans le bulbe olfactif, via la diminution de la L-lysine et de la saccharopine. Cet impact est significatif en utilisant la base de données KEGG, mais pas en utilisant SMPDB, ce qui peut être dû à des différences dans les voies métaboliques intégrées à ces deux bases de données. La diminution de ces deux métabolites peut indiquer une augmentation de la dégradation de la lysine via la voie de la saccharopine. Cette voie métabolique conduit à la production de glutamate, un neuromédiateur excitateur majeur, (Papes et al. 2001). Dans le bulbe olfactif, le glutamate est impliqué dans le décodage des odeurs, participant à l'inhibition de la transmission des signaux du bulbe olfactif au SNC (Zhao et al. 2018). Une augmentation de la production de glutamate, bien que n'ayant pas été détectée en LC-HRMS, pourrait participer à la diminution des capacités olfactives que nous avons observée chez les animaux de notre modèle (Panchenko et al. 2019). De plus, la diminution de la lysine pourrait entraîner l'inhibition de cellules sensibles aux acides aminés dans le bulbe olfactif, comme les neurones ou les tanocytes dans l'hypothalamus (Lazutkaite et al. 2017). Cette inhibition pourrait participer à la diminution des capacités olfactives (Julliard et al. 2017).

### *Effet sur le métabolisme des acides gras*

Dans notre modèle, le régime HFD a eu un impact sur le métabolisme de l'acide linoléique dans le bulbe olfactif, en entraînant une augmentation de l'abondance en acide  $\alpha$ -linoléique (GLA) et une diminution en DGLA (acide cis-8,11,14-Eicosatriénoïque) et en EPA (acide cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaénoïque), deux acides gras polyinsaturés de la voie des oméga 6 et 3, respectivement. Cet impact a été mis en évidence dans les analyses de *pathways* SMPDB, et est illustré par un impact nul sur la biosynthèse des acides gras dans les analyses KEGG.

Ces effets pourraient entraîner dans le bulbe olfactif une altération de la production de DHA (acide docosahexaénoïque), un acide gras polyinsaturé très important pour la fluidité membranaire et la signalisation neuronale, mais aussi pour la neuroprotection et la neuroinflammation (Domenichiello, Kitson, et Bazinet 2015; Calder 2016; Echeverría et al. 2017). La diminution des capacités olfactives observées chez les souris soumises à un régime HFD dans notre modèle, pourrait être associée à des altérations à ces différents niveaux dans le bulbe olfactif. En effet, on sait que les performances olfactives sont diminuées chez les rats déplétés en DHA cérébral suite à une alimentation pauvre en oméga 3, en particulier dans le bulbe olfactif (Hichami et al. 2007). On sait que les systèmes senseurs des acides gras sont

Régime HFD



Impact sur le métabolisme des acides aminés, en particulier de la lysine, et des lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés

Première étude  
métabolomique non-dirigée  
réalisée sur le bulbe olfactif

Mise en évidence de la faible  
plasticité métabolique du bulbe  
olfactif

L'impact sur le métabolisme de la  
lysine et des acides gras polyinsaturés  
pourrait être une cause des  
diminutions des performances  
olfactives associées à l'obésité

Figure 54. Résumé graphique des analyses des voies métaboliques impactées par le régime HFD post-sevrage dans le bulbe olfactif



d'importants contributeurs pour le contrôle de la balance énergétique et le bulbe olfactif possède des systèmes senseurs des acides gras (Magnan, Levin, et Luquet 2015; Julliard et al. 2017). Alors que plusieurs études montrent bien les effets de l'obésité induite par l'alimentation sur le fonctionnement du bulbe olfactif sur le plan moléculaire, électrophysiologique ou comportemental en pointant le rôle des hormones et de la perturbation des échanges énergétiques (revue dans Palouzier-Paulignan et al., 2012), notre étude est la première à s'intéresser aux effets d'un régime HFD sur le métabolome du bulbe olfactif et à identifier une voie métabolique associée aux acides gras polyinsaturés. Seule une étude lipidomique a montré l'importance des oxylipines circulantes (eicosanoïdes, docosanoïdes, and octadecanoïdes) comme signatures métabolomiques persistantes de l'obésité, dans le tissu adipeux (Hernandez-Carretero et al. 2017). Même si le régime post-sevrage a certainement des effets au-delà du bulbe olfactif pouvant expliquer les désordres olfactifs observés, la modification de cette voie de synthèse dans le bulbe olfactif sous HFD pourrait participer aux diminutions de l'olfaction constatées en contexte d'obésité (Peng et al. 2019). Un résumé graphique de l'impact métabolique du régime HFD post-sevrage sur le bulbe olfactif est présenté en **Figure 54**.

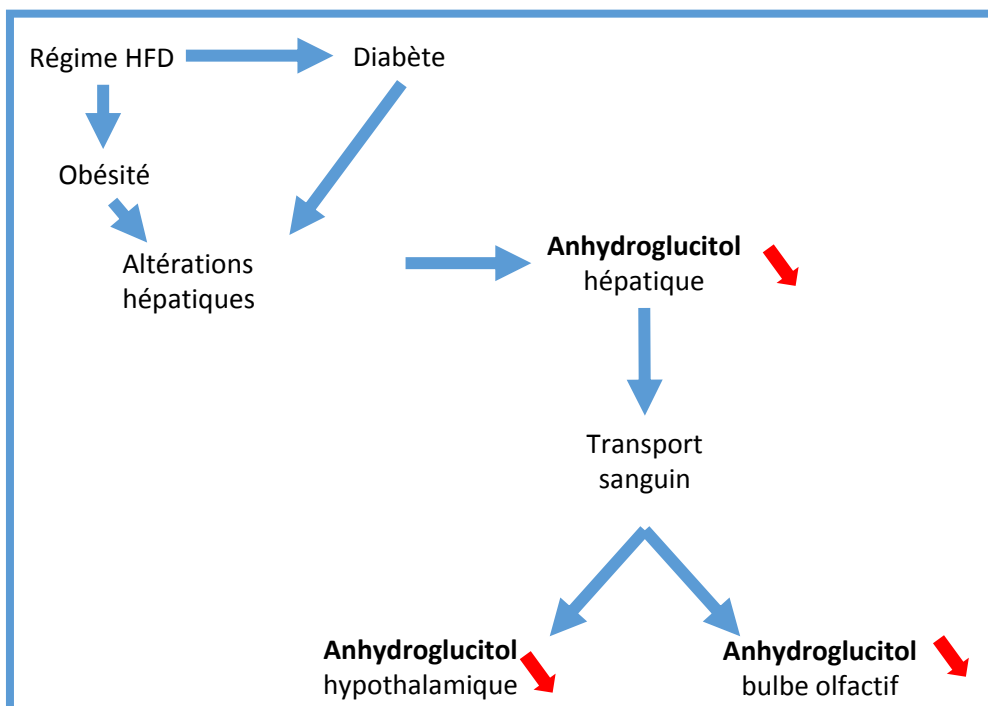
**L'impact du régime HFD sur le métabolisme des acides aminés et des acides gras dans le bulbe olfactif, pourrait expliquer en partie les faibles performances olfactives observées chez les individus HFD. Les données qui ont été produites dans notre modèle pourront servir de base de travail pour de futures recherches, en ce qui concerne les effets d'un régime hyperlipidique sur les facultés olfactives.**

### **1.3) Métabolites communs**

Parmi les métabolites impactés par le régime HFD, trois sont communs aux trois tissus et présentent chacun une amplitude d'effet similaire dans chaque tissu. L'anhydroglucitol et la saccharopine sont diminués, tandis que l'hydroxybutyrate est augmenté, chez les individus sous régime HFD post-sevrage.

#### **1.3.1) Le régime HFD entraîne une diminution de l'abondance en anhydroglucitol dans les trois tissus**

Plusieurs études ont été réalisées sur du sérum humain en contexte diabétique (W. J. Kim et Park 2013; Selvin et al. 2014; Delaney, Coley, et Brown 2015). La diminution du taux d'anhydroglucitol (1,5-AG) est directement liée au diabète. Lors de grossesses compliquées



**Figure 55. Impact du régime HFD post-sevrage sur l'anhydroglucitol**

La diminution de l'anhydroglucitol est caractéristique du développement du diabète et des altérations hépatiques. Moins d'anhydroglucitol est produit par le foie et relargué dans la circulation sanguine, ce qui se répercute sur l'abondance en anhydroglucitol dans les autres tissus de l'organisme

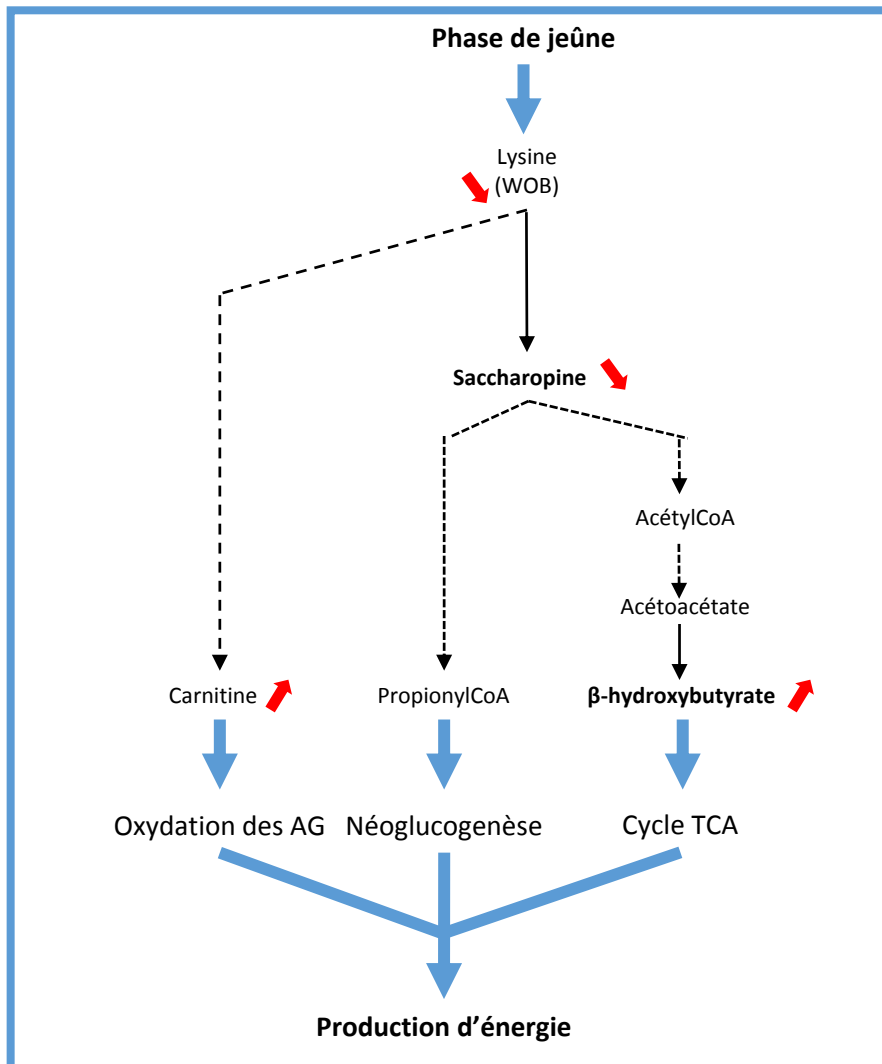
par un diabète chez l'être humain, un faible taux sanguin était associé à une augmentation du poids de naissance (Delaney, Coley, et Brown 2015). Dans ces conditions l'1,5-AG pourrait être un bon marqueur prédictif du poids de naissance de la descendance et donc des risques de développer des pathologies à long terme. Un faible taux sanguin était associé à la présence d'une rétinopathie et de troubles rénaux, deux états pathologiques associés au diabète. De plus, chez des patients sains, un faible taux sanguin de ce métabolite était associé à un diabète incident (Selvin et al. 2014). En l'absence de diabète, un faible taux sanguin de ce métabolite était associé à la présence d'une cirrhose hépatique (Yamagishi et Ohta 1998). Son faible taux serait donc dû à une diminution de sa production par le foie, lorsque ses fonctions sont altérées.

Chez la souris, un diabète induit par l'injection de streptozotocine a entraîné une diminution de la concentration de l'anhydroglucitol dans le sang, tandis qu'une injection d'insuline permettait un retour de ce taux à la normale (Yamanouchi et al. 1986). De plus, dans ce même modèle, l'utilisation d'un isotope radioactif du carbone ( $C^{14}$ ) a permis de suivre la dynamique métabolique de ce composé. Il semblerait que le foie soit un organe majeur du métabolisme de l'anhydroglucitol (Yamanouchi et al. 1986). Une analyse métabolomique réalisée dans le plasma et le foie de souris soumises ou non à un régime HFD, montrait une corrélation entre le taux hépatique et plasmatique de ce métabolite (L. O. Li et al. 2010). Cela confirme que le foie est le principal organe producteur d'anhydroglucitol et qu'une fois produit, il est relargué dans la circulation sanguine.

**Dans notre modèle, la diminution de l'abondance de l'anhydroglucitol serait donc un effet direct du régime hyperlipidique, qui entraîne une dérégulation du métabolisme glucidique, entre autre. Sa diminution atteste du développement d'un diabète ainsi que de perturbations du métabolisme hépatique, chez les mâles de notre modèle lorsqu'ils sont soumis à un régime HFD. Le fait que cette diminution soit constatée dans les trois tissus étudiés pourrait être dû au transport sanguin de ce métabolite à l'ensemble de l'organisme (Figure 55).**

### **1.3.2) Le régime HFD entraîne une diminution de l'abondance en saccharopine dans les trois tissus**

Peu d'information sont disponibles dans la littérature concernant la saccharopine en lien avec la consommation d'un régime HFD, l'essentiel des articles étant orientés vers l'étude de l'hyperlysiniémie ou de l'épilepsie dépendante à la pyridoxine. Il est possible que la diminution de la saccharopine dans les trois tissus, ainsi que de la lysine dans le bulbe olfactif



**Figure 56. Impact du régime HFD post-sevrage sur la saccharopine**

Chez les animaux sous régime HFD, la quantité de glucides apportés par l'alimentation peut être utilisée rapidement en phase de jeûne. Dans ces conditions et afin de permettre des apports énergétiques n'utilisant pas le glucose, des voies métaboliques distinctes de la glycolyse peuvent être mobilisées. En particulier, la dégradation de la lysine, révélée dans les trois tissus par une diminution de la saccharopine, peut aboutir à la production de composés utilisés pour l'oxydation des AG, la néoglucogenèse ou bien la production de corps cétoniques.

Une flèche noire continue indique une réaction enzymatique, une flèche noire discontinue indique une suite de réactions enzymatiques. Les flèches rouges indiquent la tendance observée dans notre étude.

Données issues de SMPDB, KEGG et HMDB

soit due à un relargage de la lysine dans la circulation sanguine, ce qui pourrait aboutir à un taux anormalement élevé de lysine dans le sang. Néanmoins, l'impact du régime HFD sur le métabolisme des acides aminés dans le foie et l'hypothalamus, ainsi que sur le métabolisme de la lysine dans le bulbe olfactif, nous laisse penser que sa diminution pourrait être due à une augmentation de la dégradation des AA, ce qui peut participer au cycle TCA en fournissant de l'acétyl-CoA, ainsi qu'à la production de corps cétoniques, tel que l'hydroxybutyrate, utilisés pour la production énergétique en période de jeûne.

**Au vu des voies métaboliques dans lesquelles la saccharopine est impliquée, sa diminution peut être due à une mobilisation accrue des acides aminés en réponse à un état de jeûne. Dans l'hypothalamus et le bulbe olfactif, sa diminution peut influencer la production de glutamate, ce qui pourrait participer à l'altération des facultés olfactives observées chez les individus HFD de notre modèle. Le fait que l'abondance de ce métabolite soit impactée de la même façon dans les trois tissus pourrait être dû au métabolisme hépatique, reflété dans l'hypothalamus et le bulbe olfactif via la circulation sanguine. Ou bien, cela peut être dû à des processus métaboliques aboutissant à ce résultat dans les trois tissus (Figure 56).**

### **1.3.3) Le régime HFD entraîne une augmentation de l'abondance en $\beta$ -hydroxybutyrate dans les trois tissus**

Le terme de corps cétoniques désigne les trois molécules générées lors de la cétogenèse : le  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), l'acétoacétate et l'acétone. Le BHB est le corps cétonique dont l'abondance est la plus dynamique parmi les trois. Lors de l'activation de la cétogenèse (en cas de jeûne prolongé par exemple) le niveau de BHB sanguin augmente beaucoup plus rapidement que les deux autres corps cétoniques (Lincoln, Rosiers, et Brunengraber 1987). Les régimes riches en graisses se caractérisent généralement par une oxydation accrue des acides gras (produisant des corps cétoniques tels que le BHB) et une réduction du flux glycolytique (Rho, Shao, et Stafstrom 2019). Après que les réserves de glycogène hépatique et musculaire aient été épuisées, les adipocytes relarguent des AG qui sont transportés jusqu'au foie afin d'être convertis en corps cétoniques. Ensuite, ces corps cétoniques sont distribués dans l'organisme via la circulation sanguine afin de fournir de l'énergie aux tissus de l'organisme, en étant métabolisés en Acétyl-CoA puis en ATP (Berg, Tymoczko, et Stryer 2012). La dégradation des acides aminés, notamment la lysine, permet aussi une production de corps cétoniques, via la production d'acétyl-CoA, pouvant ensuite être converti en MHG-CoA puis BHB. Un régime de type occidental (WSD), consommé

pendant 2 mois par des rats, a entraîné une augmentation de l'abondance en hydroxybutyrate, dans le cortex cérébral (Roy et al. 2013). Cela reflète bien les résultats observés dans notre modèle. De plus, lorsque ce régime est maintenu jusqu'à 19 mois, l'abondance en BHB est augmentée de 176% (Roy et al. 2013). Ces résultats révèlent le statut évolutif de l'abondance en BHB au fur et à mesure de la progression des altérations phénotypiques observées lors d'une consommation chronique d'un régime WSD.

L'application d'acétoacétate ou de BHB sur des tranches de cerveau réduit le taux d'activation des neurones GABAergiques (W. Ma, Berg, et Yellen 2007). De plus, le BHB semble avoir un effet régulateur direct sur le transporteur de glutamate vésiculaire neuronal, Vglut2 (Juge et al. 2010). L'inhibition de Vglut2 peut être un mécanisme par lequel BHB réduit la neurotransmission glutamatergique sans affecter la neurotransmission GABAergique inhibitrice. L'intégration des diverses fonctions de signalisation du BHB semble permettre l'adaptation de l'organisme à un état de jeûne. La production de corps cétonique étant activée en période de jeûne, la production de BHB pourrait favoriser cette adaptation dans les tissus extra-hépatiques, tout en affinant le contrôle du métabolisme des lipides et du glucose (Newman et Verdín 2017). L'infusion centrale de BHB a été associée à une amélioration de l'homéostasie du glucose, en augmentant le potentiel signalétique de l'insuline et de la leptine dans l'hypothalamus de rats diabétiques (Park, Kim, et Daily 2011). Ainsi, le BHB participe à la régulation du métabolisme énergétique.

Une perfusion cérébrale de corps cétoniques accroît la prise alimentaire et l'expression de peptides oréxigènes hypothalamiques. De plus, cela entraîne une augmentation transitoire de l'insulinémie et une diminution de la néoglucogenèse hépatique (Carneiro et al. 2016). Les corps cétoniques sont transportés au travers des membranes cellulaires grâce aux transporteurs MCTs et dans l'hypothalamus il existe une sous-population de neurones exprimant le transporteur MCT1. La signalisation des corps cétoniques au niveau cérébral semble agir comme un indicateur de stress énergétique, menant à une augmentation des apports alimentaires afin de maintenir les fonctions physiologiques. Les corps cétoniques seraient donc un signal menant à la préservation énergétique et à l'augmentation des apports énergétiques, afin de compenser la perception d'un déficit énergétique (Carneiro et al. 2016).

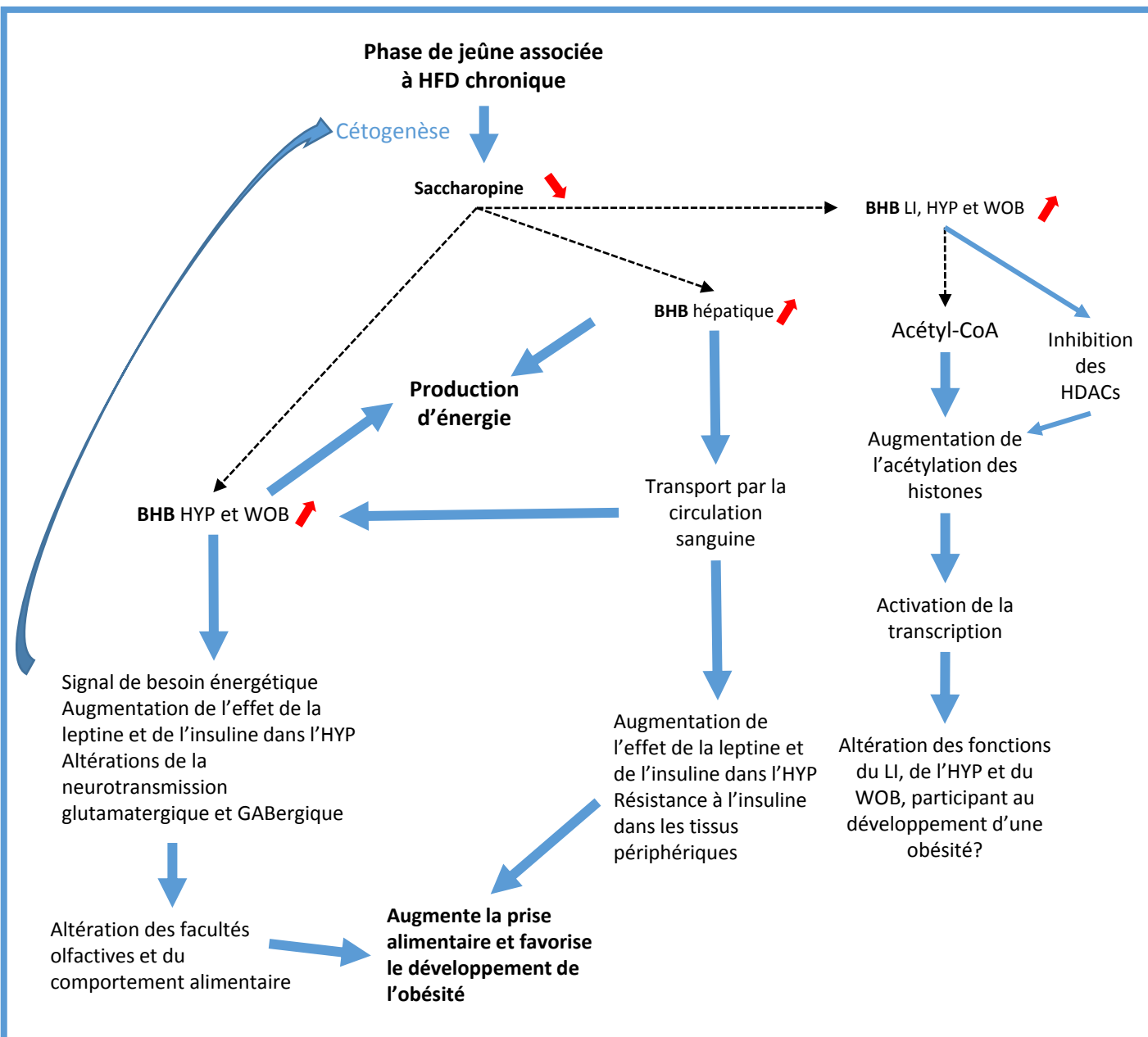
Un jeûne prolongé ou un régime HFD, induisent une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques, afin de préserver le glucose circulant pour son utilisation au niveau central. Le métabolisme du BHB pourrait donc être impliqué dans l'inhibition de la signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques, mais de nouvelles études sont

nécessaires afin de clarifier cette supposition (Rojas-Morales, Tapia, et Pedraza-Chaverri 2016).

Le BHB a la capacité de moduler les comportements alimentaires, bien que des études soient nécessaires afin de comprendre la dynamique de cette modulation. La faim active de nombreuses voies de signalisation, dans tous les tissus et systèmes de l'organisme. Ceci afin de satisfaire aux besoins énergétiques et à la balance des dépenses énergétiques. Le BHB serait l'un des mécanismes permettant cette régulation. Il faut donc voir le BHB en tant que signal de déprivation énergétique afin de comprendre ses fonctions de signalisation (Rojas-Morales, Tapia, et Pedraza-Chaverri 2016). La sensibilité à l'obésité pourrait être due en partie à une mauvaise détection des besoins énergétiques de l'organisme, ce qui se répercute sur la production de BHB (Le Foll et al. 2015). En cas de sensibilité à l'obésité, l'organisme recevrait des signaux lui indiquant constamment un déficit énergétique, entraînant un cercle vicieux d'augmentation de la prise alimentaire ou des apports énergétiques.

Le BHB a la capacité d'inhiber les histones désacétylases Hdac1, Hdac3 et Hdac4 *in vitro* (Shimazu et al. 2013). Dans des cellules de rein embryonnaire humain, cultivées en présence de BHB, il a été constaté une augmentation dose-dépendante de l'acétylation des histones, en particulier des lysines 9 et 14 de l'histone H3 (Shimazu et al. 2013). Cela pourrait constituer un mode de régulation de l'expression des gènes. Son action passerait par une inhibition des histones désacétylases mais aussi par une action indirecte, en favorisant l'activité des lysines acétyltransférases, par l'augmentation du flux d'acétyl-CoA (Newman et Verdin 2017). Néanmoins, une étude récente contredit ces faits en démontrant que le BHB possède une faible capacité à inhiber les HDAC, en particulier en comparaison du butyrate (Chriett et al. 2019). La  $\beta$ -hydroxybutyrylation des lysines des protéines (dont les histones) est aussi possible et est associée à des modifications post-transcriptionnelles (Newman et Verdin 2017; Chriett et al. 2019). Cela constituerait un autre mode de régulation de la transcription, bien que les effets du BHB soient controversés (Chriett et al. 2019).

**Dans notre modèle, l'augmentation de l'abondance en BHB observée dans les trois tissus analysés, pourrait être due à une augmentation de sa production hépatique, en raison d'une augmentation des substrats nécessaires à sa production, ou de l'état de jeûne des animaux. Une autre cause de son augmentation pourrait être un/des défaut(s) de signalisation, qui entraînerait une augmentation de sa production. Il est aussi possible que ces deux causes soit associées, aboutissant à son augmentation. De plus, la signalisation au niveau central aurait un effet important dans le développement de**



**Figure 57. Impact du régime HFD post-sevrage sur le  $\beta$ -hydroxybutyrate**

L'augmentation de l'hydroxybutyrate serait due à l'activation de la cétogenèse lorsque les animaux sont en phase de jeûne. Dans le cas d'une consommation chronique d'un régime HFD, cette activation pourrait se réaliser plus vite après le dernier repas en raison d'une moindre quantité de sucres utilisables. L'augmentation du BHB permet alors de produire de l'énergie pour palier au besoin énergétique. Le BHB peut aussi entraîner un cercle vicieux aboutissant à l'augmentation de la prise alimentaire, favorisant le développement d'une obésité. La machinerie épigénétique pourrait participer au développement de l'obésité via une augmentation de la transcription qui pourrait perturber les fonctions du LI, de l'HYP et du WOB.

Une flèche noire continue indique une réaction enzymatique, une flèche noire discontinue indique une suite de réactions enzymatiques. Les flèches rouges indiquent la tendance observée dans notre étude.

HFD – régime hyperlipidique ; BHB – ( $\beta$ -)hydroxybutyrate ; LI – foie ; HYP – hypothalamus ; WOB – bulbe olfactif ; HDACs – histone désacétylases

Données issues de SMPDB, KEGG et HMDB



**l'obésité en perturbant la régulation du métabolisme énergétique ainsi que le comportement alimentaire. Cela participerait ainsi à l'augmentation des apports énergétiques et au développement de l'obésité en cas de consommation chronique d'un régime hyperlipidique (Figure 57).**

#### **1.4) Effets du groupe maternel**

Dans notre modèle, nous avons mis en évidence une interaction entre le groupe maternel et le régime post-sevrage sur un pentose- ou hexose-phosphate. De plus, nous avons aussi mis en évidence une diminution de l'abondance en ansérine hépatique chez les descendants de mères obèses, indépendamment du régime post-sevrage, révélant ainsi un effet de programmation par l'obésité maternelle.

##### **1.4.1) Interaction avec le régime post-sevrage sur un pentose- ou hexose-phosphate (P/H-P)**

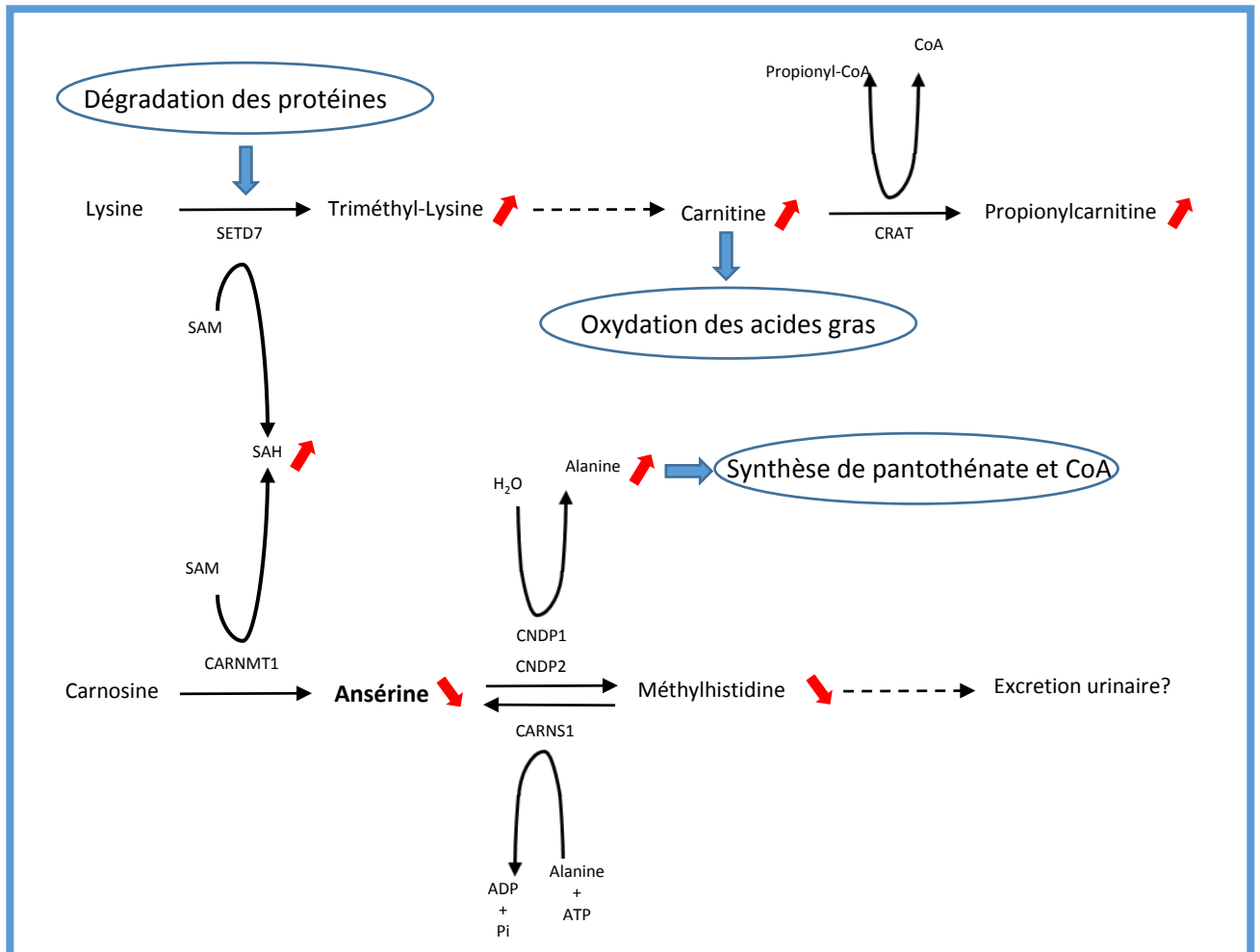
Ce composé a des identités putatives multiples : D-Fructose-1-phosphate, D-Fructose-6-phosphate, D-Mannose-6-phosphate, Galactose-1-phosphate, Glucose-1-phosphate ou Mannose-1-phosphate. L'analyse MS/MS n'a pas permis de préciser l'annotation de ce composé. Il est possible que ce ne soit pas le même composé chez chaque groupe de descendants. L'interaction entre le groupe maternel et le régime post-sevrage pourrait donc ne pas être une réalité. Comme nous ne voulons pas être trop spéculatifs, nous n'avons pas exploré cette piste plus en détail.

##### **1.4.2) Programmation de l'abondance en ansérine par l'obésité maternelle**

L'ansérine est principalement produite par une méthylation de la carnosine un dipeptide composé d'une histidine et d'une alanine (McManus 1962).

Chez l'être humain, il a été démontré que l'ansérine est absorbé par les intestins et est converti en 1-méthylhistidine et  $\beta$ -alanine par les carnosinases du sérum et des tissus (Kubomura et al. 2009). De plus, l'absorption intestinale de l'ansérine est difficilement perturbée chez l'être humain. La diminution de l'abondance en ansérine observée dans notre modèle n'est donc sûrement pas liée à un défaut d'absorption intestinale, mais plutôt à une modification de processus impliqués dans sa synthèse ou sa métabolisation.

L'ansérine et la carnosine sont des métabolites très abondants dans les tissus hépatiques de poulet ayant été hydrolysés par la pepsine (Yang et al. 2014). Chez la souris et le hamster, la consommation d'histidine et de carnosine ou d'hydrolysats de foie de poulet



**Figure 58. Réflexion sur les réactions métaboliques pouvant entraîner une diminution de l'ansérine**

La diminution de l'ansérine hépatique chez les descendants de mères OB peut être due à sa conversion en méthylhistidine, permettant un apport d'alanine, nécessaire à la synthèse de coenzyme A. Elle pourrait aussi être due à une augmentation de la dégradation protéique, participant à l'oxydation des acides gras grâce à la production de carnitine.

Une flèche noire continue indique une réaction enzymatique, une flèche noire discontinue indique une suite de réactions enzymatiques. Les flèches rouges indiquent la tendance observée dans notre étude.

Données issues de SMPDB, KEGG et HMDB

permet d'atténuer la stéatose hépatique induite par un régime hyperlipidique (Mong, Chao, et Yin 2011; Chou et al. 2014; Yang et al. 2014). Cela est dû à un effet antioxydant et hépatoprotecteur de l'ansérine. Chez des souris, chez lesquelles une stéatose hépatique a été induite par injection de thioacétamide, une injection intra-péritonéale d'hydrolysate de foie de poulet a eu des effets similaires en réduisant le phénotype de stéatose hépatique (P.-J. Chen et al. 2017). Suite à l'injection, il a été constaté, au niveau hépatique, une diminution des signaux d'inflammation (TNF- $\alpha$ ) associée à une augmentation de la concentration en acteurs du système antioxydant (superoxyde dismutases, catalases et glutathione sous sa forme réduite) (P.-J. Chen et al. 2017).

Ainsi, en cas de faible niveau d'ansérine, le foie serait moins protégé des atteintes liées au régime HFD (inflammation, stress oxydatif). La faible abondance en ansérine, mesurée chez les descendants mâles OB, pourrait être une des causes de la susceptibilité accrue à l'obésité chez ces descendants. Soumis à un régime HFD, le foie serait plus rapidement atteint par les désordres métaboliques que le régime engendre, favorisant ainsi la mise en place d'une NAFLD et participant au développement d'une obésité et des désordres physiologiques qui y sont associés.

En revanche, l'origine de la diminution de l'ansérine hépatique est encore à déterminer. Elle pourrait être due à l'augmentation de l'activité ou de la quantité des enzymes de conversion, dans le but d'approvisionner l'organisme en méthylhistidine ou en alanine. Une autre possibilité est que sa diminution soit due à une diminution des substrats nécessaires à sa méthylation : la SAM et la carnosine. Parmi les métabolites différentiellement abondants dans le foie en réponse au régime HFD, nous avons détecté une augmentation de la SAH, donc potentiellement moins de SAM disponible, bien que nous n'ayons pas détecté de différence d'abondance pour ce métabolite. Une autre voie utilisant la SAM est celle de la production de carnitine, un produit de la dégradation des protéines, nécessaire à l'oxydation des acides gras et à leur transport mitochondrial. Je propose dans l'illustration ci-contre un modèle permettant d'expliquer la diminution de l'ansérine hépatique (**Figure 58**).

A plus grande échelle, un impact de l'obésité maternelle préconceptionnelle et gestationnelle pourrait avoir des effets minimes sur différents acteurs du métabolisme de l'ansérine, qui une fois associés entraînent une diminution significative de son abondance. Cet effet de programmation par l'obésité maternelle, au niveau métabolique, entraînerait le phénotype d'obésité accrue conditionné par l'obésité maternelle observé chez les mâles F1 issus de mères OB et exposés au régime HFD pendant leur vie autonome.

De manière intéressante, la perte de poids maternelle préconceptionnelle a permis une normalisation de l'abondance en ansérine chez les descendants mâles de notre modèle. Les mécanismes impliqués dans la programmation de l'abondance en ansérine semblent donc inversés par la perte de poids, confirmant l'utilité d'une intervention nutritionnelle préconceptionnelle pour préserver la santé des descendants.

## 1.5) Perspectives

Dans le futur, il serait intéressant de procéder au dosage des métabolites dans le plasma de nos individus. Cela nous permettrait d'avoir une idée du passage dans la circulation sanguine de ces différents métabolites et identifier s'il existe un lien entre les niveaux mesurés dans le foie et ceux mesurés dans l'hypothalamus et le bulbe olfactif. En outre, ceci nous donnerait des informations transposables à l'être humain, chez lequel le métabolome est généralement exclusivement étudié sur des fluides biologiques.

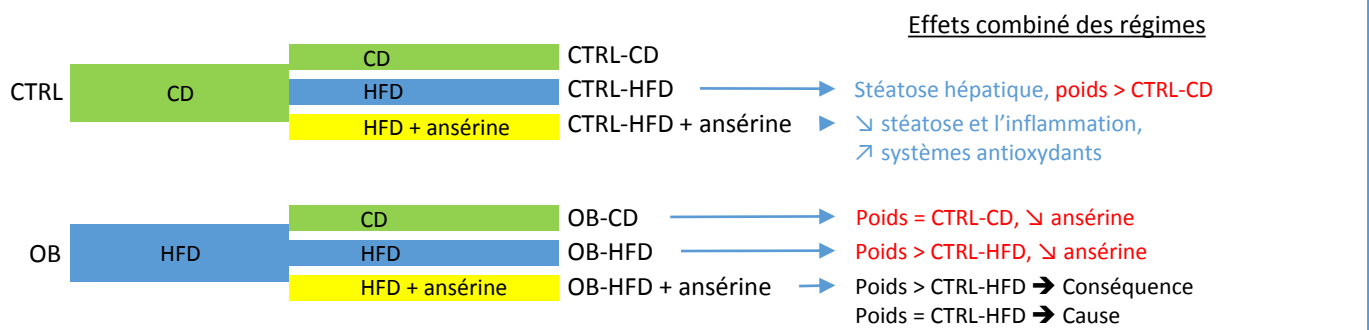
Nous pourrions aussi examiner le métabolome au stade fœtal, afin de savoir si certains des métabolites dont l'abondance est impactée par le régime HFD le sont déjà *in utero*. En particulier, chez les mères OB afin d'évaluer l'impact du régime HFD en période gestationnelle. Il serait tout de même intéressant d'examiner les fœtus des autres groupes maternels. Cela permettrait peut-être de distinguer des phénomènes de programmation précoces par l'obésité ou de la perte de poids maternelle.

En raison du dimorphisme sexuel dans la réponse au régime HFD, mis en évidence par les analyses factorielles multiples, il serait très intéressant d'étudier les femelles de notre modèle expérimental (Panchenko et al. 2019).

Afin d'avoir plus de précision quant aux causes de l'augmentation ou de la diminution des métabolites impactés par le régime HFD, il pourrait être intéressant de quantifier l'expression des gènes impliqués dans leur synthèse et leur dégradation. Par exemple, réaliser des RT-qPCR sur les gènes codant pour les enzymes LYS1, LYS9, CARNMT1 et CNBP2 pourrait nous apporter des éléments de réponse concernant les raisons de la diminution de la saccharopine et de l'ansérine. Une alternative serait de mesurer les activités de ces enzymes.

Au regard des voies métaboliques impactées dans le foie et le bulbe olfactif par le régime HFD et le fait que les tissus cérébraux soient très riches en lipides, il serait intéressant de réaliser une analyse du lipidome de ces trois tissus.

Concernant l'ansérine, il pourrait être intéressant d'étudier les marques épigénétiques des gènes impliqués dans sa synthèse et sa dégradation. Cela permettrait de savoir si des



**Figure 59. Modèle animal d'étude du rôle de l'ansérine dans l'aggravation de l'obésité des descendants de mères OB**

Les effets indiqués en bleu proviennent de la littérature, ceux indiqués en rouge ont été observés dans notre modèle expérimental. En noir sont indiqués les effets qui pourraient résulter d'une supplémentation alimentaire en ansérine.

CTRL – groupe contrôle ; OB – groupe obèse ; CD – régime contrôle ; HFD – régime hyperlipidique

processus épigénétiques sont impliqués dans la programmation de la diminution de l'ansérine hépatique, par l'obésité maternelle.

Afin de savoir si la diminution de l'ansérine est une cause ou une conséquence de l'aggravation de l'obésité des descendants de mères obèses, un modèle animal pourrait être réalisé. Ce modèle serait composé de deux groupes maternels, CTRL et OB et de trois groupes de descendants, CD, HFD et HFD supplémentés en ansérine (**Figure 59**).

Il serait possible, chez l'être humain, de procéder à des dosages de l'ansérine hépatique en utilisant des biopsies *in vivo* ou du tissu hépatique post-mortem. Cela permettrait d'estimer le potentiel de l'ansérine en tant que biomarqueur des altérations hépatiques ou de la sensibilité à l'obésité. L'ansérine pourrait aussi être étudiée dans un but thérapeutique, afin de lutter contre les altérations hépatiques associées à l'obésité.

## 2) Epigénétique et métabolisme

### 2.1) Originalités et limites

Au cours de cette thèse, nous avons voulu étudier l'épigénome du foie fœtal dans chacun des groupes maternels, étant donné que le statut métabolique maternel préconceptionnel est associé, dans ce tissu, à une modification de l'expression de *Kat2a*, *Kat3a*, *Kat6b*, *Kat13d*, *Hdac2*, *Hdac6* et *Brd2* (Panchenko et al. 2016). Par conséquent, nous avons orienté nos recherches sur l'acétylation des histones, en particulier de l'histone H4 (**Tableau 5**). La littérature, dans le contexte de la DOHaD, se focalise généralement sur des marques de type méthylation de l'ADN (Gallou-Kabani et al. 2010; Ruchat et al. 2013), ou alors, en ce qui concerne les modifications des histones, sur la méthylation (Raychaudhuri et al. 2008; Anne Gabory et al. 2012). De très rares articles ont étudié les effets de l'obésité maternelle sur l'acétylation des histones et ces études sont orientées vers l'histone H3 (Aagaard-Tillery et al. 2008; Raychaudhuri et al. 2008; Upadhyaya et al. 2017; Tabachnik et al. 2017). De plus, les bases de données épigénomiques ne comportent pas encore de données de ce type, ce qui aurait permis de les enrichir, et par la même occasion, apporter de nouvelles pistes de réflexion au monde scientifique. Le manque d'informations à ce propos a néanmoins constitué une limite à notre étude, nous empêchant de nous baser sur de précédentes études afin de choisir une marque cohérente à analyser.

### 2.2) Approche utilisée : western blot

Afin de sélectionner une marque d'acétylation de l'histone H4 à analyser par séquençage de chromatine immunoprécipitée (ChIP-seq), nous avons réalisé des western blots sur des échantillons de foies fœtaux, dans chaque groupe maternel du modèle TPMP.

Le western blot est une technique qui a déjà été utilisée dans notre laboratoire, ce qui nous assure une certaine expertise dans la mise en œuvre de la technique et l'interprétation des résultats (Gabory et al. 2012 et non publié). De plus, cette technique est fréquemment utilisée dans des études en contexte de DOHaD (Raychaudhuri et al. 2008; Aagaard-Tillery et al. 2008; Tabachnik et al. 2017).

Cependant, cette approche est limitée à différents niveaux. Tout d'abord, cette technique est semi-quantitative, et par conséquent, nécessite une reproductibilité élevée afin d'interpréter les résultats. Or, cette reproductibilité n'a pas été atteinte lors de nos expérimentations. L'analyse des acétylations d'H4 par western blot a été compliquée par la

Activité	Histone 3	Total	K4	K9	K14	K18	K23	K27	K36	K37	K56	K79	K115	K122
Reader/Writer	Kat2a			++	++	+	+	+	+		+			
Reader/Writer	Kat3a-CREBBP-CBP/P300			+	+	+		++	+		++			+
Writer	Kat6b	+												
Writer	Kat13d-CLOCK				+									
Eraser	Hdac2	+												
Eraser	Hdac6	+												
	Brd2													

	Histone 4	Total	K5	K8	K12	K16	K20	K44	K91ac
Reader/Writer	Kat2a		++	++	++	++			+
Reader/Writer	Kat3a-CREBBP-CBP/P300		+	+	++	+	+	+	
Writer	Kat6b	+							
	Kat13d-CLOCK								
Eraser	Hdac2	+							
Eraser	Hdac6	+							
Reader	Brd2		+	+	++				

+ Histome  
+ WERAM database

**Tableau 7. Mise à jour des enzymes de la machinerie épigénétique différemment exprimées dans le foie fœtal et des modifications post-traductionnelles des histones H3 et H4 qui y sont associées**

Données issues des sites [www.atrec.org/histome/](http://www.atrec.org/histome/)  
<http://weram.biocuckoo.org/>

Adapté de Khare et al. 2011  
Adapté de Xu et al. 2017



faible offre d'anticorps spécifiques de ces marques (deux ou trois fournisseurs disponibles et un seul choix pour chaque marque). De plus, nous voulions utiliser les mêmes anticorps pour le western blot et le ChIP-seq afin de conserver une bonne spécificité de liaison. Cependant, peu d'anticorps disponibles satisfaisaient à cette contrainte.

### 2.3) Approches alternatives au western blot

Aujourd'hui, dans l'optique de sélectionner une marque à analyser en ChIP-seq, les autres approches qui peuvent être utilisées sont :

- **ELISA/Multiplex** : Cette approche permettrait de quantifier précisément les différentes marques d'histones de nos échantillons. Néanmoins, aucun kit n'a été développé dans le but d'analyser l'acétylation de l'histone H4, la majorité étant dédiée à l'analyse des modifications post-traductionnelles de l'histone H3.

- **Spectrométrie de masse** : Cette méthode est hautement quantitative et permettrait d'avoir une image globale des modifications post-traductionnelles des histones H3 et H4 (Nie et al. 2017). Néanmoins, cette approche comporte un certain nombre de contraintes : la quantité de matériel biologique à utiliser est élevée, de même que le coût de telles analyses, de plus, un outillage spécifique et une expertise sont nécessaires à sa mise en œuvre et à l'interprétation des résultats. Néanmoins, il me semble que cette approche est la plus satisfaisante afin de sélectionner une marque d'histone à analyser en ChIP-seq.

### 2.4) Perspectives

Depuis le début de cette thèse, les données de la littérature ont évolué. Notamment, une base de données (WERAM - *Writers, Erasers and Readers protein of Histone Acetylation and Methylation system Database*), regroupant des informations au sujet des enzymes de la machinerie épigénétique et des marques qui leur sont associées, est disponible (Y. Xu et al. 2017). D'après cette base de données, les protéines Kat2a, Kat3a, Kat6b, Kat13d, Hdac2, Hdac6 et Brd2 sont également associées à l'acétylation de lysines de l'histone H3 (**Tableau 7**). Néanmoins, le fait que Brd2 soit associé à l'acétylation de trois lysines de l'histone H4 nous conforte dans l'intérêt qu'aurait l'analyse de l'épigénome du foie fœtal pour ce type de marques.

De plus, une étude réalisée récemment chez la souris en utilisant la spectrométrie de masse, montre qu'une obésité induite par l'alimentation à l'âge adulte, peut entraîner des modifications d'acétylation de plusieurs marques de l'histone H3 dans le foie (Nie et al.

2017). Et de manière intéressante, concernant l'histone H4, la seule marque d'acétylation impactée était H4K16ac, diminuée chez les souris obèses. Le fait que cette marque soit diminuée est intéressant étant donné que, dans le placenta de rats en contexte de RCUI, notre équipe a montré une diminution de H4K16ac (**Gabory et al. non publié**). En analysant cette marque dans le foie fœtal de chaque groupe maternel de notre modèle, nous nous attendons à identifier des régions génomiques, qui pourraient être affectés par le statut métabolique maternel préconceptionnel et/ou *in utero*. L'étude des gènes associés à ces régions pourraient nous apporter des réponses quant aux causes et aux conséquences de la modification de l'expression des gènes de la machinerie épigénétique identifiés dans le foie fœtal de notre modèle (Panchenko et al. 2016). L'expertise dans l'analyse de ChIP-seq, est acquise dans notre laboratoire suite à différentes collaborations, dont une à laquelle j'ai eu l'opportunité de participer en suivant une formation dans le Département des Sciences Animales de l'Université de Davis, Californie, dans le cadre d'un échange au sein du consortium FAANG (*Functional Annotation of Animal Genome*) (**Annexe Protocole ChIP-seq**).

De plus, la théorie de l'épigénétique dans le contexte de la DOHaD postule que, si des modifications de l'épigénome fœtal se produisent, en réponse au statut métabolique maternel pendant la période *in utero*, elles peuvent être un des facteurs contribuant à la mémoire de cet environnement, jusqu'à l'âge adulte (D. J. Barker 1990; Gluckman et Hanson 2008). Cette mémorisation serait alors en partie responsable de la sensibilité de la descendance à son environnement individuel ainsi que des prédispositions à développer des pathologies (Warner et Ozanne 2010; Godfrey et al. 2017). Dans notre modèle animal, des individus ont été suivis jusqu'à l'âge adulte et, de plus, c'est chez ces animaux qu'a été réalisée notre étude métabolomique. Il est donc tout à fait pertinent d'étudier leur épigénome, puisque des effets du statut métabolique maternel persistent, au niveau du métabolome hépatique de ces animaux, jusqu'à l'âge adulte (**Safi-Stibler et al. en relecture**).

Dans le cas où il ne serait pas possible de choisir une marque unique à étudier, une alternative au ChIP-seq peut être l'**ATAC-seq** (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing*). Cette approche permet d'avoir un aperçu de l'état de compaction de la chromatine. Cependant, il est difficile de savoir si l'état de la chromatine qui est observé est dû à de la méthylation ou de l'acétylation, à moins de réaliser des expériences de ChIP-qPCR sur les régions du génome identifiées en ATAC-seq.

### 3) Conclusions générales

Les travaux réalisés sur ce modèle nous ont permis de montrer que la perte de poids maternelle préconceptionnelle est bénéfique, elle permet de corriger les effets de l'obésité maternelle préconceptionnelle et gestationnelle.

Les analyses métabolomiques réalisées au cours de cette thèse sur le foie, l'hypothalamus et le bulbe olfactif, nous ont permis d'identifier différentes voies métaboliques particulièrement sensibles au régime hyperlipidique des souris, indépendamment du régime de leur mère. Le foie est l'organe le plus sensible aux perturbations engendrées par un régime hyperlipidique et son métabolisme doit s'adapter à cet état physiologique. L'hypothalamus et le bulbe olfactif résistent mieux au régime HFD, potentiellement du au contrôle de l'homéostasie énergétique qui est très finement régulé dans le SNC.

De façon intéressante, nous avons détecté un métabolite hépatique qui présente une interaction entre le groupe maternel et le régime post-sevrage des descendants. Néanmoins, l'identité de ce métabolite est encore à déterminer. De manière inattendue, nous avons mis en lumière, dans le foie, un effet de programmation par l'obésité maternelle, sur l'ansérine, ainsi qu'une normalisation de cet effet, permis par la perte de poids maternelle préconceptionnelle.

Ces travaux témoignent des effets négatifs de l'obésité maternelle sur la descendance, ainsi que de l'utilité de procéder à une intervention nutritionnelle avant d'entamer une gestation. Néanmoins, l'effet le plus fort, reste celui du régime propre d'un individu. Les effets de l'obésité maternelle ne sont pas définitifs et peuvent ne jamais se révéler dans le cas où les descendants grandissent dans un environnement sain. Cela prouve qu'il reste de l'espoir dans la lutte contre l'obésité, et qu'établir un environnement alimentaire sain pour les générations à venir est le premier et peut être même, le plus important des objectifs à atteindre.

# **BIBLIOGRAPHIE**

# Bibliographie

- Aagaard-Tillery, Kjersti M, Kevin Grove, Jacalyn Bishop, Xingrao Ke, Qi Fu, Robert McKnight, et Robert H Lane. 2008. « Developmental Origins of Disease and Determinants of Chromatin Structure: Maternal Diet Modifies the Primate Fetal Epigenome ». *Journal of Molecular Endocrinology* 41 (2): 91-102. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0025>.
- Acosta, Omteotl, Vanessa I. Ramirez, Susanne Lager, Francesca Gaccioli, Donald J. Dudley, Theresa L. Powell, et Thomas Jansson. 2015. « Increased Glucose and Placental GLUT-1 in Large Infants of Obese Nondiabetic Mothers ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 212 (2): 227.e1-227.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.08.009>.
- Adane, Akilew Awoke, Annette Dobson, Leigh Tooth, et Gita D. Mishra. 2018. « Maternal Preconception Weight Trajectories Are Associated with Offsprings' Childhood Obesity ». *International Journal of Obesity* 42 (7): 1265-74. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0078-1>.
- Agius, Lorraine. 2008. « Glucokinase and Molecular Aspects of Liver Glycogen Metabolism ». *Biochemical Journal* 414 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1042/BJ20080595>.
- Agnoux, Aurore Martin, Jean-Philippe Antignac, Gilles Simard, Guillaume Poupeau, Dominique Darmaun, Patricia Parnet, et Marie-Cécile Alexandre-Gouabau. 2014. « Time Window-Dependent Effect of Perinatal Maternal Protein Restriction on Insulin Sensitivity and Energy Substrate Oxidation in Adult Male Offspring ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307 (2): R184-97. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00015.2014>.
- Ahmad, Muhammad Saeed, Munirah Alsaleh, Torben Kimhofer, Sultan Ahmad, Wisam Jamal, Siraj Omar Wali, Jeremy Kirk Nicholson, Zoheir Abdullah Damanhoury, et Elaine Holmes. 2017. « Metabolic Phenotype of Obesity in a Saudi Population ». *Journal of Proteome Research* 16 (2): 635-44. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00710>.
- Aimé, P., P. Duchamp-Viret, M.A. Chaput, A. Savigner, M. Mahfouz, et A.K. Julliard. 2007. « Fasting Increases and Satiating Decreases Olfactory Detection for a Neutral Odor in Rats ». *Behavioural Brain Research* 179 (2): 258-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.02.012>.
- Aimé, Pascaline, Brigitte Palouzier-Paulignan, Rita Salem, Dolly Al Koborssy, Samuel Garcia, Claude Duchamp, Caroline Romestaing, et A. Karyn Julliard. 2014. « Modulation of Olfactory Sensitivity and Glucose-Sensing by the Feeding State in Obese Zucker Rats ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00326>.
- Al Aïn, Syrina, Laurine Belin, Benoist Schaal, et Bruno Patris. 2013. « How Does a Newly Born Mouse Get to the Nipple? Odor Substrates Eliciting First Nipple Grasping and Sucking Responses: First Nipple Grasping in Mouse Newborns ». *Developmental Psychobiology* 55 (8): 888-901. <https://doi.org/10.1002/dev.21082>.
- Alexandre-Gouabau, Marie-Cécile, Frédérique Courant, Gwénaëlle Le Gall, Thomas Moyon, Dominique Darmaun, Patricia Parnet, Bérengère Coupé, et Jean-Philippe Antignac. 2011. « Offspring Metabolomic Response to Maternal Protein Restriction in a Rat Model of Intrauterine Growth Restriction (IUGR) ». *Journal of Proteome Research* 10 (7): 3292-3302. <https://doi.org/10.1021/pr2003193>.
- Alfaradhi, Maria Z., et Susan E. Ozanne. 2011. « Developmental Programming in Response to Maternal Overnutrition ». *Frontiers in Genetics* 2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00027>.
- Al-Nimr, Rima Itani, Rubina Hakeem, Julie M. Moreschi, Sina Gallo, Joann M. McDermid, Maria Pari-Keener, Barbara Stahnke, Constantina Papoutsakis, Deepa Handu, et Feon W. Cheng. 2019. « Effects of Bariatric Surgery on Maternal and Infant Outcomes of Pregnancy—An Evidence Analysis Center Systematic Review ». *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2019.02.008>.
- Alonso, Cristina, David Fernández-Ramos, Marta Varela-Rey, Ibon Martínez-Arranz, Nicolás Navasa, Sebastiaan M. Van Liempd, José L. Lavín Trueba, et al. 2017. « Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Gastroenterology* 152 (6): 1449-1461.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.015>.
- Anand, Bal K., et John R. Brobeck. 1951. « HYPOTHALAMIC CONTROL OF FOOD INTAKE IN RATS AND CATS ». *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*, 18.
- Antoniades, L. 2003. « Association of Birth Weight with Osteoporosis and Osteoarthritis in Adult Twins ». *Rheumatology* 42 (6): 791-96. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg227>.

- Attig, Linda, Anne Gabory, et Claudine Junien. 2010. « Early Nutrition and Epigenetic Programming: Chasing Shadows »: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13 (3): 284-93. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328338aa61>.
- Bader, Andrea, Bettina Klein, Heinz Breer, et Jörg Strotmann. 2012. « Connectivity from OR37 Expressing Olfactory Sensory Neurons to Distinct Cell Types in the Hypothalamus ». *Frontiers in Neural Circuits* 6. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00084>.
- Badonnel, Karine, Marie-Christine Lacroix, Didier Durieux, Régine Monnerie, Monique Caillol, et Christine Baly. 2014. « Rat Strains with Different Metabolic Statuses Differ in Food Olfactory-Driven Behavior ». *Behavioural Brain Research* 270 (août): 228-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.011>.
- Badonnel, Karine, Marie-Christine Lacroix, Régine Monnerie, Didier Durieux, Monique Caillol, et Christine Baly. 2012. « Chronic Restricted Access to Food Leading to Undernutrition Affects Rat Neuroendocrine Status and Olfactory-Driven Behaviors ». *Hormones and Behavior* 62 (2): 120-27. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.05.010>.
- Baker, Peter R., et Jacob E. Friedman. 2018. « Mitochondrial Role in the Neonatal Predisposition to Developing Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 128 (9): 3692-3703. <https://doi.org/10.1172/JCI120846>.
- Baquero, Arian F., Melissa A. Kirigiti, Karalee C. Baquero, Shin J. Lee, M. Susan Smith, et Kevin L. Grove. 2015. « Developmental Changes in Synaptic Distribution in Arcuate Nucleus Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 35 (22): 8558-69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0058-15.2015>.
- Barker, D. J. 1990. « The Fetal and Infant Origins of Adult Disease. » *BMJ* 301 (6761): 1111-1111. <https://doi.org/10.1136/bmj.301.6761.1111>.
- Barker, D. J., C. Osmond, J. Golding, D. Kuh, et M. E. Wadsworth. 1989. « Growth in Utero, Blood Pressure in Childhood and Adult Life, and Mortality from Cardiovascular Disease. » *BMJ* 298 (6673): 564-67. <https://doi.org/10.1136/bmj.298.6673.564>.
- Barker D. J. P., et Osmond C. 1986. « INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES ». *The Lancet*.
- Barker, D. J. P., K. L. Thornburg, C. Osmond, E. Kajantie, et J. G. Eriksson. 2010. « Beyond Birthweight: The Maternal and Placental Origins of Chronic Disease ». *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 1 (06): 360-64. <https://doi.org/10.1017/S2040174410000280>.
- Barouki, Robert, Karine Audouze, Xavier Coumoul, Florence Demenais, et Dominique Gauguier. 2018. « Integration of the Human Exposome with the Human Genome to Advance Medicine ». *Biochimie* 152 (septembre): 155-58. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.023>.
- Beauchamp, Gary K, et Julie A Mennella. 2009. « Early Flavor Learning and Its Impact on Later Feeding Behavior »: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 48 (Suppl 1): S25-30. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31819774a5>.
- Bellamy, Leanne, Juan-Pablo Casas, Aroon D Hingorani, et David Williams. 2009. « Type 2 Diabetes Mellitus after Gestational Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis » 373: 7.
- Benyaich, Abdelhay, et Kaouther Benyaich. 2017. « Les peptides orexigènes et anorexigènes impliqués dans la régulation centrale et périphérique du comportement alimentaire », 30.
- Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, et Lubert Stryer. 2012. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman.
- Berthoud, Hans-Rudolf, et Christopher Morrison. 2008. « The Brain, Appetite, and Obesity ». *Annual Review of Psychology* 59 (1): 55-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093551>.
- Binder, Natalie K., Natalie J. Hannan, et David K. Gardner. 2012. « Paternal Diet-Induced Obesity Retards Early Mouse Embryo Development, Mitochondrial Activity and Pregnancy Health ». Édité par Claudia Kappen. *PLoS ONE* 7 (12): e52304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052304>.
- Bloomfield, Frank H., Tanith Alexander, Mariana Muelbert, et Friederike Beker. 2017. « Smell and Taste in the Preterm Infant ». *Early Human Development* 114 (novembre): 31-34. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2017.09.012>.
- Bloor, Ian D., et Michael E. Symonds. 2014. « Sexual Dimorphism in White and Brown Adipose Tissue with Obesity and Inflammation ». *Hormones and Behavior* 66 (1): 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.007>.
- Bogaerts, Annick, Lieveke Ameye, Evelyne Martens, et Roland Devlieger. 2015. « Weight Loss in Obese Pregnant Women and Risk for Adverse Perinatal Outcomes »: *Obstetrics & Gynecology* 125 (3): 566-75. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000677>.
- Bolton, Jessica L, et Staci D Bilbo. 2014. « Developmental Programming of Brain and Behavior by Perinatal Diet: Focus on Inflammatory Mechanisms ». *Translational Research* 16 (3): 14.

- Bortolin, R C, A R Vargas, J Gasparotto, P R Chaves, C E Schnorr, Kd B Martinello, A K Silveira, T K Rabelo, D P Gelain, et J C F Moreira. 2018. « A New Animal Diet Based on Human Western Diet Is a Robust Diet-Induced Obesity Model: Comparison to High-Fat and Cafeteria Diets in Term of Metabolic and Gut Microbiota Disruption ». *International Journal of Obesity* 42 (3): 525-34. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.225>.
- Boudoures, Anna L., Jessica Saben, Andrea Drury, Suzanne Scheaffer, Zeel Modi, Wendy Zhang, et Kelle H. Moley. 2017. « Obesity-Exposed Oocytes Accumulate and Transmit Damaged Mitochondria Due to an Inability to Activate Mitophagy ». *Developmental Biology* 426 (1): 126-38. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.04.005>.
- Bradley, R. M., et C. M. Mistretta. 1975. « Fetal Sensory Receptors ». *Physiological Reviews* 55 (3): 352-82. <https://doi.org/10.1152/physrev.1975.55.3.352>.
- Bricambert, Julien, Jonatan Miranda, Fadila Benhamed, Jean Girard, Catherine Postic, et Renaud Dentin. 2010. « Salt-Inducible Kinase 2 Links Transcriptional Coactivator P300 Phosphorylation to the Prevention of ChREBP-Dependent Hepatic Steatosis in Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 120 (12): 4316-31. <https://doi.org/10.1172/JCI41624>.
- Brooks, Chandler McC. 1988. « The History of Thought Concerning the Hypothalamus and Its Functions ». *Brain Research Bulletin* 20 (6): 657-67. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(88\)90075-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(88)90075-5).
- Brooks, George A. 1987. « Amino acid and protein metabolism during exercise and recovery. » 19 (5): S150–S156.
- Broughton, Darcy, et Emily Jungheim. 2015. « A Focused Look at Obesity and the Preimplantation Trophoblast ». *Seminars in Reproductive Medicine* 34 (01): 005-010. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1570032>.
- Bruce, Kimberley D., Felino R. Cagampang, Marco Argenton, Junlong Zhang, Priya L. Ethirajan, Graham C. Burdge, Adrian C. Bateman, et al. 2009. « Maternal High-Fat Feeding Primes Steatohepatitis in Adult Mice Offspring, Involving Mitochondrial Dysfunction and Altered Lipogenesis Gene Expression ». *Hepatology* 50 (6): 1796-1808. <https://doi.org/10.1002/hep.23205>.
- Brumbaugh, David E., et Jacob E. Friedman. 2014. « Developmental Origins of Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Pediatric Research* 75 (1-2): 140-47. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.193>.
- Buckley, Alexandra J., Benjamin Keserü, Julie Briody, Madeline Thompson, Susan E. Ozanne, et Campbell H. Thompson. 2005. « Altered Body Composition and Metabolism in the Male Offspring of High Fat–Fed Rats ». *Metabolism* 54 (4): 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.11.003>.
- Butruille, Laura, Lucie Marousez, Charène Pourpe, Frédéric Oger, Simon Lecoutre, Daniel Catheline, Solvig Görs, et al. 2019. « Maternal High-Fat Diet during Suckling Programs Visceral Adiposity and Epigenetic Regulation of Adipose Tissue Stearoyl-CoA Desaturase-1 in Offspring ». *International Journal of Obesity*, janvier. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0310-z>.
- Cadiou, Hervé, Imad Aoudé, Bassim Tazir, Adrien Molinas, Claire Fenech, Nicolas Meunier, et Xavier Grosmaître. 2014. « Postnatal Odorant Exposure Induces Peripheral Olfactory Plasticity at the Cellular Level ». *The Journal of Neuroscience* 34 (14): 4857-70. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0688-13.2014>.
- Calder, Philip C. 2016. « Docosahexaenoic Acid ». *Annals of Nutrition and Metabolism* 69 (1): 8-21. <https://doi.org/10.1159/000448262>.
- Cardenas-Perez, Robbi E., Lizeth Fuentes-Mera, Ana Laura de la Garza, Ivan Torre-Villalvazo, Luis A. Reyes-Castro, Humberto Rodriguez-Rocha, Aracely Garcia-Garcia, et al. 2018. « Maternal Overnutrition by Hypercaloric Diets Programs Hypothalamic Mitochondrial Fusion and Metabolic Dysfunction in Rat Male Offspring ». *Nutrition & Metabolism* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0279-6>.
- Carneiro, Lionel, Sarah Geller, Xavier Fioramonti, Audrey Hébert, Cendrine Repond, Corinne Leloup, et Luc Pellerin. 2016. « Evidence for Hypothalamic Ketone Body Sensing: Impact on Food Intake and Peripheral Metabolic Responses in Mice ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 310 (2): E103-15. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00282.2015>.
- Carobbio, Stefania, Vanessa Pellegrinelli, et Antonio Vidal-Puig. 2017. « Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome ». In *Obesity and Lipotoxicity*, édité par Ayse Basak Engin et Atila Engin, 960:161-96. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_7).
- Casas, Eduard, et Tanya Vavouri. 2014. « Sperm Epigenomics: Challenges and Opportunities ». *Frontiers in Genetics* 5 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00330>.

- Catalano, P., et S H deMouzon. 2015. « Maternal Obesity and Metabolic Risk to the Offspring: Why Lifestyle Interventions May Have Not Achieved the Desired Outcomes ». *International Journal of Obesity* 39 (4): 642-49. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.15>.
- Catalano, P. M., L. Presley, J. Minium, et S. Hauguel-de Mouzon. 2009. « Fetuses of Obese Mothers Develop Insulin Resistance in Utero ». *Diabetes Care* 32 (6): 1076-80. <https://doi.org/10.2337/dc08-2077>.
- Chang, G.-Q., V. Gaysinskaya, O. Karatayev, et S. F. Leibowitz. 2008. « Maternal High-Fat Diet and Fetal Programming: Increased Proliferation of Hypothalamic Peptide-Producing Neurons That Increase Risk for Overeating and Obesity ». *Journal of Neuroscience* 28 (46): 12107-19. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008>.
- Chao De La Barca, Juan Manuel, Delphine Mirebeau-Prunier, Valérie Moal, Pascal Reynier, Roselyne Garnotel, et Gilles Simard. 2015. « Metabolome and mass spectrometry: new biomedical analysis perspectives ». *Annales de biologie clinique* 73 (1): 126-30. <https://doi.org/10.1684/abc.2014.1020>.
- Chao, Fei-Fei, David L Stiers, et Joseph A Ontko. 1986. « Hepatocellular Triglyceride Synthesis and Transfer to Lipid Droplets and Nascent Very Low Density Lipoproteins ». *Journal of Lipid Research* 27: 1174-81.
- Chavatte-Palmer, Pascale, Anne Tarrade, et Delphine Rousseau-Ralliard. 2016. « Diet before and during Pregnancy and Offspring Health: The Importance of Animal Models and What Can Be Learned from Them ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (6): 586. <https://doi.org/10.3390/ijerph13060586>.
- Chawla, Jasvinder, et David Kvarnberg. 2014. « Hydrosoluble Vitamins ». In *Handbook of Clinical Neurology*, 120:891-914. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00059-0>.
- Chen, Hui, David Simar, et Margaret J. Morris. 2014. « Maternal Obesity Impairs Brain Glucose Metabolism and Neural Response to Hyperglycemia in Male Rat Offspring ». *Journal of Neurochemistry* 129 (2): 297-303. <https://doi.org/10.1111/jnc.12623>.
- Chen, Po-Ju, Jung-Kai Tseng, Yi-Ling Lin, Yi-Hsieng Samuel Wu, Yi-Tse Hsiao, Jr-Wei Chen, et Yi-Chen Chen. 2017. « Protective Effects of Functional Chicken Liver Hydrolysates against Liver Fibrogenesis: Antioxidation, Anti-Inflammation, and Antifibrosis ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (24): 4961-69. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01403>.
- Chen, Yiming, Yen-Chu Lin, Tzu-Wei Kuo, et Zachary A. Knight. 2015. « Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits ». *Cell* 160 (5): 829-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.033>.
- Chen, Z. J., et C. S. Pikaard. 1997. « Epigenetic Silencing of RNA Polymerase I Transcription: A Role for DNA Methylation and Histone Modification in Nucleolar Dominance ». *Genes & Development* 11 (16): 2124-36. <https://doi.org/10.1101/gad.11.16.2124>.
- Chew, Tina W., Xinyin Jiang, Jian Yan, Wei Wang, Amanda L. Lusa, Bradley J. Carrier, Allyson A. West, et al. 2011. « Folate Intake, Mthfr Genotype, and Sex Modulate Choline Metabolism in Mice ». *The Journal of Nutrition* 141 (8): 1475-81. <https://doi.org/10.3945/jn.111.138859>.
- Choi, William T., Mehmet Tosun, Hyun-Hwan Jeong, Cemal Karakas, Fatih Semerci, Zhandong Liu, et Mirjana Maletić-Savatić. 2018. « Metabolomics of Mammalian Brain Reveals Regional Differences ». *BMC Systems Biology* 12 (S8): 127. <https://doi.org/10.1186/s12918-018-0644-0>.
- Chou, Chung-Hsi, Sheng-Yao Wang, Yi-Tsen Lin, et Yi-Chen Chen. 2014. « Antioxidant Activities of Chicken Liver Hydrolysates by Pepsin Treatment ». *International Journal of Food Science & Technology* 49 (7): 1654-62. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12471>.
- Chriett, Sabrina, Arkadiusz Dąbek, Martyna Wojtala, Hubert Vidal, Aneta Balcerczyk, et Luciano Pirola. 2019. « Prominent Action of Butyrate over  $\beta$ -Hydroxybutyrate as Histone Deacetylase Inhibitor, Transcriptional Modulator and Anti-Inflammatory Molecule ». *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36941-9>.
- Clarke, I.J. 2014. « Hypothalamus as an Endocrine Organ ». In *Comprehensive Physiology*, édité par Ronald Terjung, 217-53. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140019>.
- Clotman, F. 2005. « Control of Liver Cell Fate Decision by a Gradient of TGF Signaling Modulated by Onecut Transcription Factors ». *Genes & Development* 19 (16): 1849-54. <https://doi.org/10.1101/gad.340305>.
- Coan, P. M., E. Angiolini, I. Sandovici, G. J. Burton, M. Constância, et A. L. Fowden. 2008. « Adaptations in Placental Nutrient Transfer Capacity to Meet Fetal Growth Demands Depend on Placental Size in Mice: Adaptations in Placental Nutrient Transfer Capacity ». *The Journal of Physiology* 586 (18): 4567-76. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156133>.
- Collins, Sheila, Tonya L Martin, Richard S Surwit, et Jacques Robidoux. 2004. « Genetic Vulnerability to Diet-Induced Obesity in the C57BL/6J Mouse: Physiological and Molecular Characteristics ». *Physiology & Behavior* 81 (2): 243-48. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.006>.



- Contu, Laura, et Cheryl Hawkes. 2017. « A Review of the Impact of Maternal Obesity on the Cognitive Function and Mental Health of the Offspring ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (5): 1093. <https://doi.org/10.3390/ijms18051093>.
- Cordier, Anne-Gaël, Pauline Léveillé, Charlotte Dupont, Anne Tarrade, Olivier Picone, Thibaut Larcher, Michèle Dahirel, et al. 2013. « Dietary Lipid and Cholesterol Induce Ovarian Dysfunction and Abnormal LH Response to Stimulation in Rabbits ». Édité par Stephen Franks. *PLoS ONE* 8 (5): e63101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063101>.
- Crawford, Laura Wilding, Julie F. Foley, et Susan A. Elmore. 2010. « Histology Atlas of the Developing Mouse Hepatobiliary System with Emphasis on Embryonic Days 9.5-18.5 ». *Toxicologic Pathology* 38 (6): 872-906. <https://doi.org/10.1177/0192623310374329>.
- Crowther, Lisa M., Déborah Mathis, Martin Poms, et Barbara Plecko. 2019. « New Insights into Human Lysine Degradation Pathways with Relevance to Pyridoxine-dependent Epilepsy Due to Antiquitin Deficiency ». *Journal of Inherited Metabolic Disease*, avril. <https://doi.org/10.1002/jimd.12076>.
- Cummings, Diana M., et Leonardo Belluscio. 2008. « Charting Plasticity in the Regenerating Maps of the Mammalian Olfactory Bulb ». *The Neuroscientist* 14 (3): 251-63. <https://doi.org/10.1177/1073858408315026>.
- Dahlhoff, Christoph, Stefanie Worsch, Manuela Sailer, Björn A. Hummel, Jarlei Fiamoncini, Kirsten Uebel, Rima Obeid, et al. 2014. « Methyl-Donor Supplementation in Obese Mice Prevents the Progression of NAFLD, Activates AMPK and Decreases Acyl-Carnitine Levels ». *Molecular Metabolism* 3 (5): 565-80. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.04.010>.
- Davis, Anne. 2015. « Pandemic of Pregnant Obese Women: Is It Time to Re-Evaluate Antenatal Weight Loss? ». *Healthcare* 3 (3): 733-49. <https://doi.org/10.3390/healthcare3030733>.
- Dearden, Laura, et Susan E. Ozanne. 2015. « Early Life Origins of Metabolic Disease: Developmental Programming of Hypothalamic Pathways Controlling Energy Homeostasis ». *Frontiers in Neuroendocrinology* 39 (octobre): 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.08.001>.
- Deems, Daniel A., Richard L. Doty, R. Gregg Settle, Victoria Moore-Gillon, Paul Shaman, Andrew F. Mester, Charles P. Kimmelman, Vernon J. Brightman, et James B. Snow. 1991. « Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center ». *Archives of otolaryngology-head & neck surgery* 117 (5): 519-528.
- Delage, Barbara, et Roderick H. Dashwood. 2008. « Dietary Manipulation of Histone Structure and Function ». *Annual Review of Nutrition* 28 (1): 347-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155354>.
- Delaney, Shani S., R. Yates Coley, et Zane Brown. 2015. « 1,5-Anhydroglucitol: A New Predictor of Neonatal Birth Weight in Diabetic Pregnancies ». *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 189 (juin): 55-58. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.03.021>.
- Dellschaft, Neele S, Marie-Cecile Alexandre-Gouabau, David S Gardner, Jean-Philippe Antignac, Duane H Keisler, Helen Budge, Michael E Symonds, et Sylvain P Sebert. 2015. « Effect of Pre- and Postnatal Growth and Post-Weaning Activity on Glucose Metabolism in the Offspring ». *Journal of Endocrinology* 224 (2): 171-82. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0600>.
- Denis, Raphaël G.P., Aurélie Joly-Amado, Emily Webber, Fanny Langlet, Marie Schaeffer, Stéphanie L. Padilla, Céline Cansell, et al. 2015. « Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons ». *Cell Metabolism* 22 (4): 646-57. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.011>.
- Desai, Mina, Dave Gayle, Jooby Babu, et Michael G. Ross. 2007. « The Timing of Nutrient Restriction during Rat Pregnancy/Lactation Alters Metabolic Syndrome Phenotype ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 196 (6): 555.e1-555.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.11.036>.
- Desai, Mina, Tie Li, et Michael G. Ross. 2011. « Hypothalamic Neurosphere Progenitor Cells in Low Birth-Weight Rat Newborns: Neurotrophic Effects of Leptin and Insulin ». *Brain Research* 1378 (mars): 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.080>.
- Dewaele, Aurélie, Marie-Annick Persuy, Karine Badonnel, Nicolas Meunier, Didier Durieux, Johan Castille, Angélique Favreau-Peigné, et Christine Baly. 2018. « Chronic Perinatal Odour Exposure with Heptaldehyde Affects Odour Sensitivity and Olfactory System Homeostasis in Prewaning Mice ». *Behavioural Brain Research* 347 (juillet): 414-24. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.026>.
- Dias-Rocha, Camilla P., Mariana M. Almeida, Erika M. Santana, Julia C.B. Costa, Juliana G. Franco, Carmen C. Pazos-Moura, et Isis H. Trevenzoli. 2018. « Maternal High-Fat Diet Induces Sex-Specific Endocannabinoid System Changes in Newborn Rats and Programs Adiposity, Energy Expenditure and Food Preference in Adulthood ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 51 (janvier): 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.09.019>.

- Díaz-Guerra, Eva, Jaime Pignatelli, Vanesa Nieto-Estévez, et Carlos Vicario-Abejón. 2013. « Transcriptional Regulation of Olfactory Bulb Neurogenesis: Neurogenesis in The Olfactory Bulb ». *The Anatomical Record* 296 (9): 1364-82. <https://doi.org/10.1002/ar.22733>.
- Diouf, Ibrahima, Marie Aline Charles, Olivier Thiebaugeorges, Anne Forhan, Monique Kaminski, et Barbara Heude. 2011. « Maternal Weight Change before Pregnancy in Relation to Birthweight and Risks of Adverse Pregnancy Outcomes ». *European Journal of Epidemiology* 26 (10): 789-96. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9599-9>.
- Domenichiello, Anthony F., Alex P. Kitson, et Richard P. Bazinet. 2015. « Is Docosahexaenoic Acid Synthesis from  $\alpha$ -Linolenic Acid Sufficient to Supply the Adult Brain? » *Progress in Lipid Research* 59 (juillet): 54-66. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.002>.
- Donnelly, Kerry L., Coleman I. Smith, Sarah J. Schwarzenberg, Jose Jessurun, Mark D. Boldt, et Elizabeth J. Parks. 2005. « Sources of Fatty Acids Stored in Liver and Secreted via Lipoproteins in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (5): 1343-51. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.
- Dorman, David C, Sandra L Allen, Janusz Z Byczkowski, Luz Claudio, J Edward Fisher Jr, Jeffrey W Fisher, G Jean Harry, et al. 2001. « Methods to Identify and Characterize Developmental Neurotoxicity for Human Health Risk Assessment. III: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations ». *Environmental Health Perspectives* 109: 11.
- Doty, Richard. 2009. « The Olfactory System and Its Disorders ». *Seminars in Neurology* 29 (01): 074-081. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1124025>.
- Dunford, Ashley R., et Janice M. Sangster. 2017. « Maternal and Paternal Periconceptional Nutrition as an Indicator of Offspring Metabolic Syndrome Risk in Later Life through Epigenetic Imprinting: A Systematic Review ». *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 11 (décembre): S655-62. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.04.021>.
- Dupont, Charlotte, Laurent Kappeler, Sarah Saget, Valérie Grandjean, et Rachel Lévy. 2019. « Role of MiRNA in the Transmission of Metabolic Diseases Associated With Paternal Diet-Induced Obesity ». *Frontiers in Genetics* 10 (avril). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00337>.
- Echeverría, Francisca, Rodrigo Valenzuela, María Catalina Hernandez-Rodas, et Alfonso Valenzuela. 2017. « Docosahexaenoic Acid (DHA), a Fundamental Fatty Acid for the Brain: New Dietary Sources ». *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 124 (septembre): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.08.001>.
- Edlow, Andrea G. 2017. « Maternal Obesity and Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders in Offspring: Maternal Obesity and Offspring Neurodevelopmental Disorders ». *Prenatal Diagnosis* 37 (1): 95-110. <https://doi.org/10.1002/pd.4932>.
- El Hajj Chehadeh, Sarah, Grégory Pourié, Nicolas Martin, Jean-Marc Alberto, Jean-Luc Daval, Jean-Louis Guéant, et Brigitte Leininger-Muller. 2014. « Gestational Methyl Donor Deficiency Alters Key Proteins Involved in Neurosteroidogenesis in the Olfactory Bulbs of Newborn Female Rats and Is Associated with Impaired Olfactory Performance ». *British Journal of Nutrition* 111 (6): 1021-31. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003553>.
- Elizondo-Vega, Roberto, Christian Cortes-Campos, Maria J. Barahona, Karina A. Oyarce, Claudio A. Carril, et Maria A. García-Robles. 2015. « The Role of Tanycytes in Hypothalamic Glucosensing ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19 (7): 1471-82. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12590>.
- Ennis, M., K. A. Hamilton, et A. Hayar. 2007. « Neurochemistry of the Main Olfactory System ». In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, édité par Abel Lajtha et Dianna A. Johnson, 137-204. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30374-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30374-1_6).
- ENP. 2016. « Enquête nationale périnatale Rapport 2016 Les naissances et les établissements Situation et évolution depuis 2010 ». 2016. <http://www.xn--epop-inserm-ebb.fr/> et <http://drees.solidarites-sante.gouv.fr/etudes-et-statistiques/publications/recueils-ouvrages-et-rapports/rapports/article/enquete-nationale-perinatale-2016-les-naissances-et-les-etablissements>.
- Eslam, Mohammed, Luca Valenti, et Stefano Romeo. 2018. « Genetics and Epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical Impact ». *Journal of Hepatology* 68 (2): 268-79. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.003>.
- Ezan, Eric, François Becher, Henri Benech, François Fenaille, Christophe Junot, Aloïse Mabondzo, et Alain Pruvost. 2010. « Research Spotlight: Drug Bioanalysis and Biomarker Discovery at the Commissariat à l'énergie Atomique et Aux Énergies Alternatives ». *Bioanalysis* 2 (4): 713-17. <https://doi.org/10.4155/bio.10.16>.

- Fabris, Luca, Massimiliano Cadamuro, Louis Libbrecht, Peggy Raynaud, Carlo Spirli, Romina Fiorotto, Lajos Okolicsanyi, Frederic Lemaigre, Mario Strazzabosco, et Tania Roskams. 2007. « Epithelial Expression of Angiogenic Growth Factors Modulate Arterial Vasculogenesis in Human Liver Development ». *Hepatology* 47 (2): 719-28. <https://doi.org/10.1002/hep.22015>.
- Feng, D., T. Liu, Z. Sun, A. Bugge, S. E. Mullican, T. Alenghat, X. S. Liu, et M. A. Lazar. 2011. « A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism ». *Science* 331 (6022): 1315-19. <https://doi.org/10.1126/science.1198125>.
- Férézou-Viala, Jacqueline, Anne-France Roy, Colette Sérougne, Daniel Gripois, Michel Parquet, Virginie Bailleux, Arieh Gertler, et al. 2007. « Long-Term Consequences of Maternal High-Fat Feeding on Hypothalamic Leptin Sensitivity and Diet-Induced Obesity in the Offspring ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (3): R1056-62. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00117.2007>.
- Fernandez-Twinn, Denise S., et Susan E. Ozanne. 2010. « Early Life Nutrition and Metabolic Programming: Early Life Programming ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212 (1): 78-96. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05798.x>.
- Fleming, Tom P., Judith J. Eckert, et Oleg Denisenko. 2017. « The Role of Maternal Nutrition During the Periconceptional Period and Its Effect on Offspring Phenotype ». In *Periconception in Physiology and Medicine*, édité par Alireza Fazeli et William V. Holt, 1014:87-105. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62414-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62414-3_5).
- Forsdahl, A. 1977. « Are Poor Living Conditions in Childhood and Adolescence an Important Risk Factor for Arteriosclerotic Heart Disease? », 5.
- Forsum, Elisabet, Anne Lise Brantsæter, Anna-Sigrid Olafsdottir, SjurdurF. Olsen, et Inga Thorsdottir. 2013. « Weight Loss before Conception: A Systematic Literature Review ». *Food & Nutrition Research* 57 (1): 20522. <https://doi.org/10.3402/fnr.v57i0.20522>.
- Franco, J. G., T. P. Fernandes, C. P. D. Rocha, C. Calviño, C. C. Pazos-Moura, P. C. Lisboa, E. G. Moura, et I. H. Trevenzoli. 2012. « Maternal High-Fat Diet Induces Obesity and Adrenal and Thyroid Dysfunction in Male Rat Offspring at Weaning: Maternal High Fat Diet Programmes Adrenal and Thyroid Function ». *The Journal of Physiology* 590 (21): 5503-18. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240655>.
- Franklin, Tamara B., Holger Russig, Isabelle C. Weiss, Johannes Gräff, Natacha Linder, Aubin Michalon, Sandor Vizi, et Isabelle M. Mansuy. 2010. « Epigenetic Transmission of the Impact of Early Stress Across Generations ». *Biological Psychiatry* 68 (5): 408-15. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036>.
- Frias, Antonio E., Terry K. Morgan, Anne E. Evans, Juha Rasanen, Karen Y. Oh, Kent L. Thornburg, et Kevin L. Grove. 2011. « Maternal High-Fat Diet Disturbs Uteroplacental Hemodynamics and Increases the Frequency of Stillbirth in a Nonhuman Primate Model of Excess Nutrition ». *Endocrinology* 152 (6): 2456-64. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1332>.
- Frias, Carmen, Carmen Torrero, Mirelta Regalado, et Manuel Salas. 2009. « Development of Mitral Cells and Olfactory Bulb Layers in Neonatally Undernourished Rats ». *Nutritional Neuroscience* 12 (3): 96-104. <https://doi.org/10.1179/147683009X423238>.
- Friedman, Jacob E. 2018. « Developmental Programming of Obesity and Diabetes in Mouse, Monkey, and Man in 2018: Where Are We Headed? » *Diabetes* 67 (11): 2137-51. <https://doi.org/10.2337/dbi17-0011>.
- Fu, Q, P Olson, D Rasmussen, B Keith, M Williamson, K K Zhang, et L Xie. 2016. « A Short-Term Transition from a High-Fat Diet to a Normal-Fat Diet before Pregnancy Exacerbates Female Mouse Offspring Obesity ». *International Journal of Obesity* 40 (4): 564-72. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.236>.
- Gabory, A., L. Attig, et C. Junien. 2011. « Developmental Programming and Epigenetics ». *American Journal of Clinical Nutrition* 94 (6\_Suppl): 1943S-1952S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000927>.
- Gabory, Anne. 2011. « Epigenetic Mechanisms Involved in Developmental Nutritional Programming ». *World Journal of Diabetes* 2 (10): 164. <https://doi.org/10.4239/wjcd.v2.i10.164>.
- Gabory, Anne, Laure Ferry, Isabelle Fajardy, Luc Jouneau, Jean-David Gothié, Alexandre Vigé, Cécile Fleur, et al. 2012. « Maternal Diets Trigger Sex-Specific Divergent Trajectories of Gene Expression and Epigenetic Systems in Mouse Placenta ». Édité par Marcia B. Aguila. *PLoS ONE* 7 (11): e47986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047986>.
- Gadaleta, Raffaella Maria, et Luca Magnani. 2014. « Nuclear Receptors and Chromatin: An Inducible Couple ». *Journal of Molecular Endocrinology* 52 (2): R137-49. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0170>.
- Gallou-Kabani, Catherine, Anne Gabory, Jörg Tost, Mohsen Karimi, Sylvain Mayeur, Jean Lesage, Elsa Boudadi, et al. 2010. « Sex- and Diet-Specific Changes of Imprinted Gene Expression and DNA Methylation in

- Mouse Placenta under a High-Fat Diet ». Édité par Joseph Najbauer. *PLoS ONE* 5 (12): e14398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014398>.
- Gallou-Kabani, Catherine, Alexandre Vigé, Marie-Sylvie Gross, Catherine Boileau, Jean-Pierre Rabes, Jamilla Fruchart-Najib, Jean-Philippe Jais, et Claudine Junien. 2007. « Resistance to High-Fat Diet in the Female Progeny of Obese Mice Fed a Control Diet during the Periconceptual, Gestation, and Lactation Periods ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 292 (4): E1095-1100. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00390.2006>.
- Gascuel, Jean, Aleth Lemoine, Caroline Rigault, Frédérique Datiche, Alexandre Benani, Luc Penicaud, et Laura Lopez-Mascaraque. 2012. « Hypothalamus-Olfactory System Crosstalk: Orexin A Immunostaining in Mice ». *Frontiers in Neuroanatomy* 6. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00044>.
- Gaudet, Laura, Zachary M. Ferraro, Shi Wu Wen, et Mark Walker. 2014. « Maternal Obesity and Occurrence of Fetal Macrosomia: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *BioMed Research International* 2014: 1-22. <https://doi.org/10.1155/2014/640291>.
- Gaztañaga, Mirari, P. Ezequiel Aranda-Fernández, et M. Gabriela Chotro. 2015. « Prenatal Exposure to Vanilla or Alcohol Induces Crawling after These Odors in the Neonate Rat: The Role of Mu and Kappa Opioid Receptor Systems ». *Physiology & Behavior* 148 (septembre): 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.046>.
- Gentric, Géraldine, et Chantal Desdouets. 2014. « Polyploidization in liver tissue ». *The American journal of pathology* 184 (2): 322-331.
- Girard, Jean. 1993. « La gluconéogenèse : une voie métabolique essentielle au maintien de l'homéostasie glucidique du nouveau-né » 9: 10.
- Gluckman, P D, et M A Hanson. 2008. « Developmental and Epigenetic Pathways to Obesity: An Evolutionary-Developmental Perspective ». *International Journal of Obesity* 32 (S7): S62-71. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.240>.
- Gniuli, Donatella, Alessandra Calcagno, Maria Emiliana Caristo, Alessandra Mancuso, Veronica Macchi, Geltrude Mingrone, et Roberto Vettor. 2008. « Effects of High-Fat Diet Exposure during Fetal Life on Type 2 Diabetes Development in the Progeny ». *Journal of Lipid Research* 49 (9): 1936-45. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800033-JLR200>.
- Godfrey, Keith M, Rebecca M Reynolds, Susan L Prescott, Moffat Nyirenda, Vincent W V Jaddoe, Johan G Eriksson, et Birit F P Broekman. 2017. « Influence of Maternal Obesity on the Long-Term Health of Offspring ». *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 5 (1): 53-64. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30107-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30107-3).
- Gonzalez-Riano, Carolina, Antonia Garcia, et Coral Barbas. 2016. « Metabolomics Studies in Brain Tissue: A Review ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 130 (octobre): 141-68. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.008>.
- Goodarzi, Mark O. 2018. « Genetics of Obesity: What Genetic Association Studies Have Taught Us about the Biology of Obesity and Its Complications ». *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 6 (3): 223-36. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30200-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30200-0).
- Gordillo, M., T. Evans, et V. Gouon-Evans. 2015. « Orchestrating Liver Development ». *Development* 142 (12): 2094-2108. <https://doi.org/10.1242/dev.114215>.
- Grandjean, P, et PJ Landrigan. 2006. « Developmental Neurotoxicity of Industrial Chemicals » 368: 12.
- Grant, Wilmon F., Melanie B. Gillingham, Ayesha K. Batra, Natasha M. Fewkes, Sarah M. Comstock, Diana Takahashi, Theodore P. Braun, Kevin L. Grove, Jacob E. Friedman, et Daniel L. Marks. 2011. « Maternal High Fat Diet Is Associated with Decreased Plasma n-3 Fatty Acids and Fetal Hepatic Apoptosis in Nonhuman Primates ». Édité par Virginia Vitzthum. *PLoS ONE* 6 (2): e17261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017261>.
- Gray, Clint, Mark H. Vickers, Stephanie A. Segovia, Xiaohuan D. Zhang, et Clare M. Reynolds. 2015. « A Maternal High Fat Diet Programmes Endothelial Function and Cardiovascular Status in Adult Male Offspring Independent of Body Weight, Which Is Reversed by Maternal Conjugated Linoleic Acid (CLA) Supplementation ». Édité par Marcia B. Aguila. *PLOS ONE* 10 (2): e0115994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115994>.
- Grayson, B. E., P. R. Lévasseur, S. M. Williams, M. S. Smith, D. L. Marks, et K. L. Grove. 2010. « Changes in Melanocortin Expression and Inflammatory Pathways in Fetal Offspring of Nonhuman Primates Fed a High-Fat Diet ». *Endocrinology* 151 (4): 1622-32. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1019>.

- Grayson, B.E., S.E. Allen, S.K. Billes, S.M. Williams, M.S. Smith, et K.L. Grove. 2006. « Prenatal Development of Hypothalamic Neuropeptide Systems in the Nonhuman Primate ». *Neuroscience* 143 (4): 975-86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.055>.
- Gregorio, Bianca M., Vanessa Souza-Mello, Jorge J. Carvalho, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda, et Marcia B. Aguila. 2010. « Maternal High-Fat Intake Predisposes Nonalcoholic Fatty Liver Disease in C57BL/6 Offspring ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 203 (5): 495.e1-495.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.042>.
- Grijalva, James, et Khashayar Vakili. 2013. « Neonatal Liver Physiology ». *Seminars in Pediatric Surgery* 22 (4): 185-89. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2013.10.006>.
- Guenard, F., Y. Deshaies, K. Cianflone, J. G. Kral, P. Marceau, et M.-C. Vohl. 2013. « Differential Methylation in Glucoregulatory Genes of Offspring Born before vs. after Maternal Gastrointestinal Bypass Surgery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (28): 11439-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216959110>.
- Hackett, J. A., et M. A. Surani. 2012. « DNA Methylation Dynamics during the Mammalian Life Cycle ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1609): 20110328-20110328. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0328>.
- Hallen, André, Joanne F. Jamie, et Arthur J. L. Cooper. 2013. « Lysine Metabolism in Mammalian Brain: An Update on the Importance of Recent Discoveries ». *Amino Acids* 45 (6): 1249-72. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1590-1>.
- Hammon, H.M., J. Steinhoff-Wagner, U. Schönhusen, C.C. Metges, et J.W. Blum. 2012. « Energy Metabolism in the Newborn Farm Animal with Emphasis on the Calf: Endocrine Changes and Responses to Milk-Born and Systemic Hormones ». *Domestic Animal Endocrinology* 43 (2): 171-85. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.02.005>.
- Han, JianHua, Anika L. Dzierlenga, Zhengqiang Lu, Dean D. Billheimer, Elmira Torabzadeh, April D. Lake, Hui Li, et al. 2017. « Metabolomic Profiling Distinction of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression from a Common Rat Model: Metabolomic Profiling of Human and Rodent NAFLD ». *Obesity* 25 (6): 1069-76. <https://doi.org/10.1002/oby.21855>.
- Han, Longsen, Chao Ren, Ling Li, Xiaoyan Li, Juan Ge, Haichao Wang, Yi-Liang Miao, et al. 2018. « Embryonic Defects Induced by Maternal Obesity in Mice Derive from Stella Insufficiency in Oocytes ». *Nature Genetics* 50 (3): 432-42. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0055-6>.
- Hanci, Deniz, et Huseyin Altun. 2016. « Hunger State Affects Both Olfactory Abilities and Gustatory Sensitivity ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 273 (7): 1637-41. <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3589-6>.
- Hanson, M. A., et P. D. Gluckman. 2014. « Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? ». *Physiological Reviews* 94 (4): 1027-76. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2013>.
- HAS. 2009. « Obésité - prise en charge chirurgicale chez l'adulte - Recommandations », 26.
- Haute Autorité de Santé. 2011. « Surpoids et obésité de l'adulte : prise en charge médicale de premier recours. ». *revue neurologique* 164: 754-774.
- Heard, Edith, et Robert A. Martienssen. 2014. « Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms ». *Cell* 157 (1): 95-109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>.
- Hellstrom, I. C., S. K. Dhir, J. C. Diorio, et M. J. Meaney. 2012. « Maternal Licking Regulates Hippocampal Glucocorticoid Receptor Transcription through a Thyroid Hormone-Serotonin-NGFI-A Signalling Cascade ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1601): 2495-2510. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0223>.
- Hepper, Peter G., Deborah L. Wells, James C. Dornan, et Catherine Lynch. 2013. « Long-Term Flavor Recognition in Humans with Prenatal Garlic Experience ». *Developmental Psychobiology* 55 (5): 568-74. <https://doi.org/10.1002/dev.21059>.
- Hernandez-Carretero, A., N. Weber, M. R. La Frano, W. Ying, J. L. Rodriguez, D. D. Sears, V. Wallenius, E. Börgeson, J. W. Newman, et O. Osborn. 2017. « Obesity-induced changes in lipid mediators persist after weight loss ». *International Journal of Obesity*.
- Hetherington, A. W., et S. W. Ranson. 1942. « The Relation of Various Hypothalamic Lesions to Adiposity in the Rat ». *The Journal of Comparative Neurology* 76 (3): 475-99. <https://doi.org/10.1002/cne.900760308>.
- Hichami, A, F Datiche, S Ullah, F Lienard, J Chardigny, M Cattarelli, et N Khan. 2007. « Olfactory Discrimination Ability and Brain Expression of C-Fos, Gir and Glut1 mRNA Are Altered in N-3 Fatty Acid-Depleted Rats ». *Behavioural Brain Research* 184 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.06.010>.

- Higa, Talita S, Acauã V Spinola, Miriam H Fonseca-Alaniz, et Fabiana SantAnna Evangelista. 2014. « Comparison between Cafeteria and High-Fat Diets in the Induction of Metabolic Dysfunction in Mice », 8.
- Hivert, M. F., W. Perng, S. M. Watkins, C. S. Newgard, L. C. Kenny, B. S. Kristal, M. E. Patti, et al. 2015. « Metabolomics in the Developmental Origins of Obesity and Its Cardiometabolic Consequences ». *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 6 (2): 65-78. <https://doi.org/10.1017/S204017441500001X>.
- Hoenen, Matthias, Oliver T. Wolf, et Bettina M. Pause. 2017. « The Impact of Stress on Odor Perception ». *Perception* 46 (3-4): 366-76. <https://doi.org/10.1177/0301006616688707>.
- Hoet, J. J., et M. A. Hanson. 1999. « Intrauterine Nutrition: Its Importance during Critical Periods for Cardiovascular and Endocrine Development ». *The Journal of Physiology* 514 (3): 617-27. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.617ad.x>.
- Houston, Suzanne M., Megan M. Herting, et Elizabeth R. Sowell. 2013. « The Neurobiology of Childhood Structural Brain Development: Conception Through Adulthood ». In *The Neurobiology of Childhood*, édité par Susan L. Andersen et Daniel S. Pine, 16:3-17. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2013\\_265](https://doi.org/10.1007/7854_2013_265).
- Howe, Caitlin G, et Mary V Gamble. 2015. « Enzymatic Cleavage of Histone H3: A New Consideration When Measuring Histone Modifications in Human Samples ». *Clinical Epigenetics* 7 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s13148-014-0041-5>.
- Hryhorczuk, Cecile, Léa Décarie-Spain, Sandeep Sharma, Caroline Daneault, Christine Des Rosiers, Thierry Alquier, et Stephanie Fulton. 2017. « Saturated High-Fat Feeding Independent of Obesity Alters Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Function but Not Anxiety-like Behaviour ». *Psychoneuroendocrinology* 83 (septembre): 142-49. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.06.002>.
- Hue-Beauvais, C., G. Miranda, E. Aujean, F. Jaffrezic, E. Devinoy, P. Martin, et M. Charlier. 2017. « Diet-Induced Modifications to Milk Composition Have Long-Term Effects on Offspring Growth in Rabbits ». *Journal of Animal Science* 95 (2): 761. <https://doi.org/10.2527/jas2016.0847>.
- Igosheva, Natalia, Andrey Y. Abramov, Lucilla Poston, Judith J. Eckert, Tom P. Fleming, Michael R. Duchon, et Josie McConnell. 2010. « Maternal Diet-Induced Obesity Alters Mitochondrial Activity and Redox Status in Mouse Oocytes and Zygotes ». Édité par Thorkild I.A. Sorensen. *PLoS ONE* 5 (4): e10074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010074>.
- Inoue, Hiroshi, Wataru Ogawa, Akihiro Asakawa, Yasuo Okamoto, Akihiko Nishizawa, Michihiro Matsumoto, Kiyoshi Teshigawara, et al. 2006. « Role of Hepatic STAT3 in Brain-Insulin Action on Hepatic Glucose Production ». *Cell Metabolism* 3 (4): 267-75. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.009>.
- International Diabetes Federation. 2007. *Diabetes Atlas*. Brussels: International Diabetes Federation, Executive Office.
- Janthakhin, Yoottana, Marion Rincel, Anna-Maria Costa, Muriel Darnaudéry, et Guillaume Ferreira. 2017. « Maternal High-Fat Diet Leads to Hippocampal and Amygdala Dendritic Remodeling in Adult Male Offspring ». *Psychoneuroendocrinology* 83 (septembre): 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.05.003>.
- Jelen, Sabina, Patrizia Gena, Janne Lebeck, Aleksandra Rojek, Jeppe Praetorius, Jørgen Frøkiaer, Robert A. Fenton, Søren Nielsen, Giuseppe Calamita, et Michael Rützler. 2012. « Aquaporin-9 and Urea Transporter-A Gene Deletions Affect Urea Transmembrane Passage in Murine Hepatocytes ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 303 (11): G1279-87. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00153.2012>.
- Jeong, Ji Yun, Nam Ho Jeoung, Keun-Gyu Park, et In-Kyu Lee. 2012. « Transcriptional Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase ». *Diabetes & Metabolism Journal* 36 (5): 328. <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.5.328>.
- Jin, Ran, Sophia Banton, ViLinh T. Tran, Juna V. Konomi, Shuzhao Li, Dean P. Jones, et Miriam B. Vos. 2016. « Amino Acid Metabolism Is Altered in Adolescents with Nonalcoholic Fatty Liver Disease—An Untargeted, High Resolution Metabolomics Study ». *The Journal of Pediatrics* 172 (mai): 14-19.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.01.026>.
- Jones, A.P., D.H. Olster, et B. States. 1996. « Maternal Insulin Manipulations in Rats Organize Body Weight and Noradrenergic Innervation of the Hypothalamus in Gonadally Intact Male Offspring ». *Developmental Brain Research* 97 (1): 16-21. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(96\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(96)00128-9).
- Jones, A.P., E.N. Pothos, P. Rada, D.H. Olster, et B.G. Hoebel. 1995. « Maternal Hormonal Manipulations in Rats Cause Obesity and Increase Medial Hypothalamic Norepinephrine Release in Male Offspring ». *Developmental Brain Research* 88 (2): 127-31. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(95\)00078-R](https://doi.org/10.1016/0165-3806(95)00078-R).

- Jones, S. V., D. C. Choi, M. Davis, et K. J. Ressler. 2008. « Learning-Dependent Structural Plasticity in the Adult Olfactory Pathway ». *Journal of Neuroscience* 28 (49): 13106-11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4465-08.2008>.
- Juge, Narinobu, John A. Gray, Hiroshi Omote, Takaaki Miyaji, Tsuyoshi Inoue, Chiaki Hara, Hisayuki Uneyama, Robert H. Edwards, Roger A. Nicoll, et Yoshinori Moriyama. 2010. « Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release ». *Neuron* 68 (1): 99-112. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.002>.
- Julliard, A-Karyn, Dolly Al Koborssy, Debra A. Fadool, et Brigitte Palouzier-Paulignan. 2017. « Nutrient Sensing: Another Chemosensitivity of the Olfactory System ». *Frontiers in Physiology* 8 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00468>.
- Jun, Hee-Jin, Jinyoung Kim, Minh-Hien Hoang, et Sung-Joon Lee. 2012. « Hepatic Lipid Accumulation Alters Global Histone H3 Lysine 9 and 4 Trimethylation in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Network ». Édité par Ingrid A. Dahlman. *PLoS ONE* 7 (9): e44345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044345>.
- Junien, Claudine, Sara Fneich, Polina Panchenko, Sarah Voisin, et Anne Gabory. 2016. « Sexual Dimorphism and DOHaD through the Lens of Epigenetics ». In *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease*, 389-424. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801383-0.00020-7>.
- Junien, Claudine, Anne Gabory, et Linda Attig. 2012. « Le dimorphisme sexuel au XXI<sup>e</sup> siècle ». *médecine/sciences* 28 (2): 185-92. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012282017>.
- Jurkowska, Renata Z., Su Qin, Goran Kungulovski, Wolfram Tempel, Yanli Liu, Pavel Bashtrykov, Judith Stiefelmaier, et al. 2017. « H3K14ac Is Linked to Methylation of H3K9 by the Triple Tudor Domain of SETDB1 ». *Nature Communications* 8 (1): 2057. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02259-9>.
- Kalhan, Satish C., Lining Guo, John Edmison, Srinivasan Dasarathy, Arthur J. McCullough, Richard W. Hanson, et Mike Milburn. 2011. « Plasma Metabolomic Profile in Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Metabolism* 60 (3): 404-13. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.03.006>.
- Kalhan, Satish, et Prabhu Parimi. 2000. « Gluconeogenesis in the Fetus and Neonate ». *Seminars in Perinatology* 24 (2): 94-106. <https://doi.org/10.1053/sp.2000.6360>.
- Kapoor, Amita, Sophie Petropoulos, et Stephen G. Matthews. 2008. « Fetal Programming of Hypothalamic–Pituitary–Adrenal (HPA) Axis Function and Behavior by Synthetic Glucocorticoids ». *Brain Research Reviews* 57 (2): 586-95. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.013>.
- Karmodiya, Krishanpal, Arnaud R Krebs, Mustapha Oulad-Abdelghani, Hiroshi Kimura, et Laszlo Tora. 2012. « H3K9 and H3K14 Acetylation Co-Occur at Many Gene Regulatory Elements, While H3K14ac Marks a Subset of Inactive Inducible Promoters in Mouse Embryonic Stem Cells ». *BMC Genomics* 13 (1): 424. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-424>.
- Kass, Marley D., Stephanie A. Guang, Andrew H. Moberly, et John P. McGann. 2015. « Changes in Olfactory Sensory Neuron Physiology and Olfactory Perceptual Learning After Odorant Exposure in Adult Mice ». *Chemical Senses*, octobre, bfv065. <https://doi.org/10.1093/chemse/bfv065>.
- Kato, Hiroyuki K., Monica W. Chu, Jeffry S. Isaacson, et Takaki Komiyama. 2012. « Dynamic Sensory Representations in the Olfactory Bulb: Modulation by Wakefulness and Experience ». *Neuron* 76 (5): 962-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.037>.
- Khan, I. Y., V. Dekou, G. Douglas, R. Jensen, M. A. Hanson, L. Poston, et P. D. Taylor. 2005. « A High-Fat Diet during Rat Pregnancy or Suckling Induces Cardiovascular Dysfunction in Adult Offspring ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288 (1): R127-33. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00354.2004>.
- Khare, S. P., F. Habib, R. Sharma, N. Gadewal, S. Gupta, et S. Galande. 2012. « Histone—a Relational Knowledgebase of Human Histone Proteins and Histone Modifying Enzymes ». *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D337-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1125>.
- Kim, Dae Hyun, German Perdomo, Ting Zhang, Sandra Slusher, Sojin Lee, Brett E. Phillips, Yong Fan, et al. 2011. « FoxO6 Integrates Insulin Signaling With Gluconeogenesis in the Liver ». *Diabetes* 60 (11): 2763-74. <https://doi.org/10.2337/db11-0548>.
- Kim, Dong Won, Kelly A. Glendinning, David R. Grattan, et Christine L. Jasoni. 2016. « Maternal Obesity Leads to Increased Proliferation and Numbers of Astrocytes in the Developing Fetal and Neonatal Mouse Hypothalamus ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 53 (octobre): 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.06.005>.
- Kim, Won Jun, et Cheol-Young Park. 2013. « 1,5-Anhydroglucitol in Diabetes Mellitus ». *Endocrine* 43 (1): 33-40. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9760-6>.

- Kirk, Shona L., Anne-Maj Samuelsson, Marco Argenton, Hannah Dhonye, Theodosios Kalamatianos, Lucilla Poston, Paul D. Taylor, et Clive W. Coen. 2009. « Maternal Obesity Induced by Diet in Rats Permanently Influences Central Processes Regulating Food Intake in Offspring ». Édité par Paul A. Bartell. *PLoS ONE* 4 (6): e5870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005870>.
- Kishimoto, Masahiko, Ryoji Fujiki, Shinichiro Takezawa, Yasumasa Sasaki, Takashi Nakamura, Kazuyoshi Yamaoka, Hirochika Kitagawa, et Shigeaki Kato. 2006. « Nuclear Receptor Mediated Gene Regulation through Chromatin Remodeling and Histone Modifications ». *Endocrine Journal* 53 (2): 157-72. <https://doi.org/10.1507/endocrj.53.157>.
- Kjaer, Mette Mandrup, et Lisbeth Nilas. 2013. « Pregnancy after Bariatric Surgery - a Review of Benefits and Risks: Pregnancy after Bariatric Surgery ». *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 92 (3): 264-71. <https://doi.org/10.1111/aogs.12035>.
- Knutson, Sarah K, Brenda J Chyla, Joseph M Amann, Srividya Bhaskara, Stacey S Huppert, et Scott W Hiebert. 2008. « Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks ». *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.51>.
- Koike, Hiroyuki, Rie Ouchi, Yasuharu Ueno, Susumu Nakata, Yuta Obana, Keisuke Sekine, Yun-Wen Zheng, et al. 2014. « Polycomb Group Protein Ezh2 Regulates Hepatic Progenitor Cell Proliferation and Differentiation in Murine Embryonic Liver ». Édité par Wing-Kin Syn. *PLoS ONE* 9 (8): e104776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104776>.
- Koutcherov, Yuri, Jürgen K. Mai, et George Paxinos. 2003. « Hypothalamus of the Human Fetus ». *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26 (4): 253-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.07.002>.
- Kral, J. G., S. Biron, S. Simard, F.-S. Hould, S. Lebel, S. Marceau, et P. Marceau. 2006. « Large Maternal Weight Loss From Obesity Surgery Prevents Transmission of Obesity to Children Who Were Followed for 2 to 18 Years ». *PEDIATRICS* 118 (6): e1644-49. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1379>.
- Kubomura, Daiki, Yoshiharu Matahira, Ayano Masui, et Hideki Matsuda. 2009. « Intestinal Absorption and Blood Clearance of L-Histidine-Related Compounds after Ingestion of Anserine in Humans and Comparison to Anserine-Containing Diets ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (5): 1781-85. <https://doi.org/10.1021/jf8030875>.
- Kwong, Wilson, George Tomlinson, et Denice S. Feig. 2018. « Maternal and Neonatal Outcomes after Bariatric Surgery; a Systematic Review and Meta-Analysis: Do the Benefits Outweigh the Risks? » *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 218 (6): 573-80. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.02.003>.
- Kyrmizi, I. 2006. « Plasticity and Expanding Complexity of the Hepatic Transcription Factor Network during Liver Development ». *Genes & Development* 20 (16): 2293-2305. <https://doi.org/10.1101/gad.390906>.
- Lacroix, Marie-Christine, Monique Caillol, Didier Durieux, Régine Monnerie, Denise Grebert, Luc Pellerin, Cendrine Repond, Virginie Tolle, Philippe Zizzari, et Christine Baly. 2015. « Long-Lasting Metabolic Imbalance Related to Obesity Alters Olfactory Tissue Homeostasis and Impairs Olfactory-Driven Behaviors ». *Chemical Senses* 40 (8): 537-56. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv039>.
- Lagisz, M, H Blair, P Kenyon, T Uller, D Raubenheimer, et S Nakagawa. 2015. « Little Appetite for Obesity: Meta-Analysis of the Effects of Maternal Obesogenic Diets on Offspring Food Intake and Body Mass in Rodents ». *International Journal of Obesity* 39 (12): 1669-78. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.160>.
- Laker, Rhianna C., Travis S. Lillard, Mitsuharu Okutsu, Mei Zhang, Kyle L. Hoehn, Jessica J. Connelly, et Zhen Yan. 2014. « Exercise Prevents Maternal High-Fat Diet-Induced Hypermethylation of the *Pgc-1α* Gene and Age-Dependent Metabolic Dysfunction in the Offspring ». *Diabetes* 63 (5): 1605-11. <https://doi.org/10.2337/db13-1614>.
- Lamia, Katja A., Stephanie J. Papp, Ruth T. Yu, Grant D. Barish, N. Henriette Uhlenhaut, Johan W. Jonker, Michael Downes, et Ronald M. Evans. 2011. « Cryptochromes Mediate Rhythmic Repression of the Glucocorticoid Receptor ». *Nature* 480 (7378): 552-56. <https://doi.org/10.1038/nature10700>.
- Langlet, Fanny. 2014. « Le tanycyte, une cellule clé de l'interface hémato-hypothalamique ». *Biologie Aujourd'hui* 208 (3): 225-35. <https://doi.org/10.1051/jbio/2014025>.
- Lanham, S. A., C. Roberts, T. Hollingworth, R. Sreekumar, M. M. Elahi, F. R. Cagampang, M. A. Hanson, et R. O. C. Oreffo. 2010. « Maternal High-Fat Diet: Effects on Offspring Bone Structure ». *Osteoporosis International* 21 (10): 1703-14. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1118-4>.
- Larue, Christiane G., et Jacques Le Magnen. 1972. « The Olfactory Control of Meal Pattern in Rats ». *Physiology & Behavior* 9 (5): 817-21. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(72\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(72)90058-3).
- Lazutkaite, Greta, Alice Soldà, Kristina Lossow, Wolfgang Meyerhof, et Nicholas Dale. 2017. « Amino Acid Sensing in Hypothalamic Tanycytes via Umami Taste Receptors ». *Molecular Metabolism* 6 (11): 1480-92. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.08.015>.



- Le Foll, C., Ambrose A. Dunn-Meynell, Henry M. Miziorko, et Barry E. Levin. 2015. « Role of VMH Ketone Bodies in Adjusting Caloric Intake to Increased Dietary Fat Content in DIO and DR Rats ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308 (10): R872-78. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00015.2015>.
- LeBlanc, Erin S., Kimberly K. Vesco, Kristine L. Funk, Njeri Karanja, Ning Smith, et Victor J. Stevens. 2016. « Prepare, a Randomized Trial to Promote and Evaluate Weight Loss among Overweight and Obese Women Planning Pregnancy: Study Design and Rationale ». *Contemporary Clinical Trials* 49 (juillet): 174-80. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2016.07.002>.
- Lecomte, Virginie, Christopher A. Maloney, Kristy W. Wang, et Margaret J. Morris. 2017. « Effects of Paternal Obesity on Growth and Adiposity of Male Rat Offspring ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 312 (2): E117-25. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00262.2016>.
- Lee, C. Y. W., et G. Koren. 2010. « Maternal Obesity: Effects on Pregnancy and the Role of Pre-Conception Counselling ». *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 30 (2): 101-6. <https://doi.org/10.3109/01443610903474355>.
- Lee, Joo, Simonetta Friso, et Sang-Woon Choi. 2014. « Epigenetic Mechanisms Underlying the Link between Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases and Nutrition ». *Nutrients* 6 (8): 3303-25. <https://doi.org/10.3390/nu6083303>.
- Lee, Jooho, Yuri Kim, Simonetta Friso, et Sang-Woon Choi. 2017. « Epigenetics in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Molecular Aspects of Medicine* 54 (avril): 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.008>.
- Lelièvre, Sophie A. 2009. « Contributions of Extracellular Matrix Signaling and Tissue Architecture to Nuclear Mechanisms and Spatial Organization of Gene Expression Control ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (9): 925-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.013>.
- Lepercq, Jacques, Jean-Claude Challier, Miche Le Guerre-Millo, Miche Le Cauzac, Hubert Vidal, et Sylvie Hauguel-De Mouzon. 2001. « Prenatal Leptin Production: Evidence That Fetal Adipose Tissue Produces Leptin » 86 (6): 5.
- Lester, Barry M., Elisabeth Conradt, Linda L. LaGasse, Edward Z. Tronick, James F. Padbury, et Carmen J. Marsit. 2018. « Epigenetic Programming by Maternal Behavior in the Human Infant ». *Pediatrics* 142 (4): e20171890. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-1890>.
- Léveillé, Pauline, Anne Tarrade, Charlotte Dupont, Thibaut Larcher, Michèle Dahirel, Elodie Pומרol, Ann-Gaël Cordier, et al. 2014. « Maternal High-Fat Diet Induces Follicular Atresia but Does Not Affect Fertility in Adult Rabbit Offspring ». *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 5 (2): 88-97. <https://doi.org/10.1017/S2040174414000014>.
- Li, Jiong, Jin Huang, Jian-Shuang Li, Hong Chen, Kun Huang, et Ling Zheng. 2012. « Accumulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Lipogenesis in the Liver through Generational Effects of High Fat Diets ». *Journal of Hepatology* 56 (4): 900-907. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.018>.
- Li, Lei O., Yun-Fu Hu, Lily Wang, Matthew Mitchell, Alvin Berger, et Rosalind A. Coleman. 2010. « Early Hepatic Insulin Resistance in Mice: A Metabolomics Analysis ». *Molecular Endocrinology* 24 (3): 657-66. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0152>.
- Li, Minglan, Clare M. Reynolds, Stephanie A. Segovia, Clint Gray, et Mark H. Vickers. 2015. « Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life ». *BioMed Research International* 2015: 1-12. <https://doi.org/10.1155/2015/437107>.
- Li, W., J. D. Howard, T. B. Parrish, et J. A. Gottfried. 2008. « Aversive Learning Enhances Perceptual and Cortical Discrimination of Indiscriminable Odor Cues ». *Science* 319 (5871): 1842-45. <https://doi.org/10.1126/science.1152837>.
- Li, Wen, Erin Luxenberg, Todd Parrish, et Jay A. Gottfried. 2006. « Learning to Smell the Roses: Experience-Dependent Neural Plasticity in Human Piriform and Orbitofrontal Cortices ». *Neuron* 52 (6): 1097-1108. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.026>.
- LifeCycle Project-Maternal Obesity and Childhood Outcomes Study Group, Ellis Voerman, Susana Santos, Hazel Inskip, Pilar Amiano, Henrique Barros, Marie-Aline Charles, et al. 2019. « Association of Gestational Weight Gain With Adverse Maternal and Infant Outcomes ». *JAMA* 321 (17): 1702. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3820>.
- Lincoln, Beth C., Christine Des Rosiers, et Henri Brunengraber. 1987. « Metabolism of S-3-Hydroxybutyrate in the Perfused Rat Liver ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 259 (1): 149-56. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90480-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90480-2).

- Liu, Annie, et Nathaniel N. Urban. 2017. « Prenatal and Early Postnatal Odorant Exposure Heightens Odor-Evoked Mitral Cell Responses in the Mouse Olfactory Bulb ». *Eneuro* 4 (5): ENEURO.0129-17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0129-17.2017>.
- Liu, Xiao-Lin, Ya-Nan Ming, Jing-Yi Zhang, Xiao-Yu Chen, Min-De Zeng, et Yi-Min Mao. 2017. « Gene-Metabolite Network Analysis in Different Nonalcoholic Fatty Liver Disease Phenotypes ». *Experimental & Molecular Medicine* 49 (1): e283-e283. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.123>.
- Logan, Darren W., Lisa J. Brunet, William R. Webb, Tyler Cutforth, John Ngai, et Lisa Stowers. 2012. « Learned Recognition of Maternal Signature Odors Mediates the First Suckling Episode in Mice ». *Current Biology* 22 (21): 1998-2007. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.041>.
- Lois M. Roeder, et Bacon F. Chow. 1972. « Maternal undernutrition and its long-term effects on the offspring ». *The American Journal of Clinical Nutrition*.
- Lowe, William L., James R. Bain, Michael Nodzenski, Anna C. Reisetter, Michael J. Muehlbauer, Robert D. Stevens, Olga R. Ilkayeva, et al. 2017. « Maternal BMI and Glycemia Impact the Fetal Metabolome ». *Diabetes Care* 40 (7): 902-10. <https://doi.org/10.2337/dc16-2452>.
- Luis, T C, N M-B Killmann, et F J T Staal. 2012. « Signal Transduction Pathways Regulating Hematopoietic Stem Cell Biology: Introduction to a Series of Spotlight Reviews ». *Leukemia* 26 (1): 86-90. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.260>.
- Luquet, Serge, et Céline Cruciani-Guglielmacci. 2009. « Le contrôle central de la balance énergétique ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 44 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2008.12.001>.
- Lynch, C., C. S. Chan, et A. J. Drake. 2017. « Early Life Programming and the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 8 (3): 263-72. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000805>.
- Lynch, Patrick J., Elaine E. Thompson, Kathleen McGinnis, Yazmin I. Rovira Gonzalez, Jessica Lo Surdo, Steven R. Bauer, et Deborah A. Hursh. 2015. « Chromatin Changes at the *PPAR- $\gamma$*  Promoter During Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cell Culture Correlate With Loss of Gene Activation Potential: Chromatin Dynamics of BM-MSCs ». *STEM CELLS* 33 (7): 2169-81. <https://doi.org/10.1002/stem.1967>.
- Ma, Jun, Amanda L. Prince, David Bader, Min Hu, Radhika Ganu, Karalee Baquero, Peter Blundell, et al. 2014. « High-Fat Maternal Diet during Pregnancy Persistently Alters the Offspring Microbiome in a Primate Model ». *Nature Communications* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4889>.
- Ma, W., J. Berg, et G. Yellen. 2007. « Ketogenic Diet Metabolites Reduce Firing in Central Neurons by Opening KATP Channels ». *Journal of Neuroscience* 27 (14): 3618-25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0132-07.2007>.
- MacLean, Paul S., John E. Blundell, Julie A. Mennella, et Rachel L. Batterham. 2017. « Biological Control of Appetite: A Daunting Complexity: Biological Control of Appetite ». *Obesity* 25 (mars): S8-16. <https://doi.org/10.1002/oby.21771>.
- Magnan, Christophe, Barry E. Levin, et Serge Luquet. 2015. « Brain Lipid Sensing and the Neural Control of Energy Balance ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 418 (décembre): 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.019>.
- Manning, Sean, et Rachel L. Batterham. 2014. « The Role of Gut Hormone Peptide YY in Energy and Glucose Homeostasis: Twelve Years On ». *Annual Review of Physiology* 76 (1): 585-608. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170404>.
- Marco, Asaf, Tatiana Kisliouk, Tzliil Tabachnik, Aron Weller, et Noam Meiri. 2016. « DNA CpG Methylation (5-Methylcytosine) and Its Derivative (5-Hydroxymethylcytosine) Alter Histone Posttranslational Modifications at the *Pomc* Promoter, Affecting the Impact of Perinatal Diet on Leanness and Obesity of the Offspring ». *Diabetes* 65 (8): 2258-67. <https://doi.org/10.2337/db15-1608>.
- Marlier, Luc, Benoist Schaal, et Robert Soussignan. 1998. « Neonatal Responsiveness to the Odor of Amniotic and Lactal Fluids: A Test of Perinatal Chemosensory Continuity ». *Child Development* 69 (3): 611-23. <http://sci-hub.tw/10.1111/j.1467-8624.1998.tb06232.x>.
- Marseglia, Lucia, Sara Manti, Gabriella D'Angelo, Caterina Cuppari, Vincenzo Salpietro, Martina Filippelli, Antonio Trovato, Eloisa Gitto, Carmelo Salpietro, et Teresa Arrigo. 2015. « Obesity and Breastfeeding: The Strength of Association ». *Women and Birth* 28 (2): 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.wombi.2014.12.007>.
- Masuyama, Hisashi, Takashi Mitsui, Takeshi Eguchi, Shoko Tamada, et Yuji Hiramatsu. 2016. « The Effects of Paternal High-Fat Diet Exposure on Offspring Metabolism with Epigenetic Changes in the Mouse *Adiponectin* and *Leptin* Gene Promoters ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 311 (1): E236-45. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00095.2016>.

- Matthews, Phillippa A., Anne-Maj Samuelsson, Paul Seed, Joaquim Pombo, Jude A. Oben, Lucilla Poston, et Paul D. Taylor. 2011. « Fostering in Mice Induces Cardiovascular and Metabolic Dysfunction in Adulthood: Effects of Fostering on Offspring Phenotype in Mice ». *The Journal of Physiology* 589 (16): 3969-81. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212324>.
- Matusiak, Kristine, Helen L. Barrett, Leonie K. Callaway, et Marloes Dekker Nitert. 2014. « Periconception Weight Loss: Common Sense for Mothers, but What about for Babies? » *Journal of Obesity* 2014: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/204295>.
- Maukonen, Mirkka, Satu Männistö, et Hanna Tolonen. 2018. « A Comparison of Measured versus Self-Reported Anthropometrics for Assessing Obesity in Adults: A Literature Review ». *Scandinavian Journal of Public Health* 46 (5): 565-79. <https://doi.org/10.1177/1403494818761971>.
- Mazzocoli, Gianluigi. 2014. « Circadian Clock Circuitry in Colorectal Cancer ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (15): 4197. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4197>.
- McCarty, Richard. 2017. « Cross-Fostering: Elucidating the Effects of Genexenvironment Interactions on Phenotypic Development ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 73 (février): 219-54. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.025>.
- McCurdy, Carrie E., Jacalyn M. Bishop, Sarah M. Williams, Bernadette E. Grayson, M. Susan Smith, Jacob E. Friedman, et Kevin L. Grove. 2009. « Maternal High-Fat Diet Triggers Lipotoxicity in the Fetal Livers of Nonhuman Primates ». *Journal of Clinical Investigation*, janvier. <https://doi.org/10.1172/JCI32661>.
- McFadden, Joseph W., Susan Aja, Qun Li, Veera V. R. Bandaru, Eun-Kyoung Kim, Norman J. Haughey, Francis P. Kuhajda, et Gabriele V. Ronnett. 2014. « Increasing Fatty Acid Oxidation Remodels the Hypothalamic Neurometabolome to Mitigate Stress and Inflammation ». Édité par Makoto Makishima. *PLoS ONE* 9 (12): e115642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115642>.
- McGillick, Erin V., Mitchell C. Lock, Sandra Orgeig, et Janna L. Morrison. 2017. « Maternal Obesity Mediated Predisposition to Respiratory Complications at Birth and in Later Life: Understanding the Implications of the Obesogenic Intrauterine Environment ». *Paediatric Respiratory Reviews* 21 (janvier): 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2016.10.003>.
- McManus, Rosabelle. 1962. « Enzymatic SYNthesis of Anserine in Skeletal Muscle by N-Methylation of Carnosine ». *The Journal of Biological Chemistry* 237 (4).
- McPherson, Nicole O., Hassan W. Bakos, Julie A. Owens, Brian P. Setchell, et Michelle Lane. 2013. « Improving Metabolic Health in Obese Male Mice via Diet and Exercise Restores Embryo Development and Fetal Growth ». Édité par Marcia B. Aguila. *PLoS ONE* 8 (8): e71459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071459>.
- McPherson, Nicole O., et Michelle Lane. 2015. « Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? » *Asian journal of andrology* 17 (3): 450.
- Meguid, Michael M., John R. Gleason, et Zhong-Jin Yang. 1993. « Olfactory Bulbectomy in Rats Modulates Feeding Pattern but Not Total Food Intake ». *Physiology & Behavior* 54 (3): 471-75. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90238-B](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90238-B).
- Melnick, Igor, Nina Pronchuk, Michael A. Cowley, Kevin L. Grove, et William F. Colmers. 2007. « Developmental Switch in Neuropeptide Y and Melanocortin Effects in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus ». *Neuron* 56 (6): 1103-15. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.034>.
- Mennitti, Laís V., Juliana L. Oliveira, Carina A. Morais, Débora Estadella, Lila M. Oyama, Claudia M. Oller do Nascimento, et Luciana P. Pisani. 2015. « Type of Fatty Acids in Maternal Diets during Pregnancy and/or Lactation and Metabolic Consequences of the Offspring ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26 (2): 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.001>.
- Merle, Laëtitia, Ophélie Person, Pierre Bonnet, Stéphane Grégoire, Vanessa Soubeyre, Xavier Grosmaître, et David Jarriault. 2019. « Maternal High Fat High Sugar Diet Disrupts Olfactory Behavior but Not Mucosa Sensitivity in the Offspring ». *Psychoneuroendocrinology* 104 (juin): 249-58. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.005>.
- Migrenne, S., C. Magnan, et C. Cruciani-Guglielmacci. 2007. « Fatty Acid Sensing and Nervous Control of Energy Homeostasis ». *Diabetes & Metabolism* 33 (3): 177-82. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2007.01.006>.
- Milić, Sandra, Davorka Lulić, et Davor Štimac. 2014. « Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity: Biochemical, Metabolic and Clinical Presentations » 20 (28): 9.
- Miller, L. L., C. G. Bly, M. L. Watson, et W. F. Bale. 1951. « THE DOMINANT ROLE OF THE LIVER IN PLASMA PROTEIN SYNTHESIS ». *Journal of Experimental Medicine* 94: 431-53.

- Mitanchez, Delphine, et Pascale Chavatte-Palmer. 2018. « Review Shows That Maternal Obesity Induces Serious Adverse Neonatal Effects and Is Associated with Childhood Obesity in Their Offspring ». *Acta Paediatrica* 107 (7): 1156-65. <https://doi.org/10.1111/apa.14269>.
- Modi, Neena, Dominika Murgasova, Rikke Ruager-Martin, E Louise Thomas, Matthew J Hyde, Christopher Gale, Shalini Santhakumaran, Caroline J Doré, Afshin Alavi, et Jimmy D Bell. 2011. « The Influence of Maternal Body Mass Index on Infant Adiposity and Hepatic Lipid Content ». *Pediatric Research* 70 (3): 287-91. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318225f9b1>.
- Mong, Mei-chin, Che-yi Chao, et Mei-chin Yin. 2011. « Histidine and Carnosine Alleviated Hepatic Steatosis in Mice Consumed High Saturated Fat Diet ». *European Journal of Pharmacology* 653 (1-3): 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.12.001>.
- Monks, Jenifer, David J. Orlicky, Adrienne L. Stefanski, Andrew E. Libby, Elise S. Bales, Michael C. Rudolph, Ginger C. Johnson, et al. 2018. « Maternal Obesity during Lactation May Protect Offspring from High Fat Diet-Induced Metabolic Dysfunction ». *Nutrition & Diabetes* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0027-z>.
- Müller, T.D., R. Nogueiras, M.L. Andermann, Z.B. Andrews, S.D. Anker, J. Argente, R.L. Batterham, et al. 2015. « Ghrelin ». *Molecular Metabolism* 4 (6): 437-60. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.005>.
- Murphy, Susan K., Hyuna Yang, Cynthia A. Moylan, Herbert Pang, Andrew Dellinger, Manal F. Abdelmalek, Melanie E. Garrett, et al. 2013. « Relationship Between Methylome and Transcriptome in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Gastroenterology* 145 (5): 1076-87. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.047>.
- Nadarajah, Bagirathy, Janice E. Brunstrom, Jaime Grutzendler, Rachel O. L. Wong, et Alan L. Pearlman. 2001. « Two Modes of Radial Migration in Early Development of the Cerebral Cortex ». *Nature Neuroscience* 4 (2): 143-50. <https://doi.org/10.1038/83967>.
- NCD-RisC. 2017. « Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults ». *The Lancet*.
- Nechles, H. 1952. « FAT INGESTION AND CHYLOMICRONS ». *Annals of the New York Academy of Sciences*, n° 56: 46-54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb30201.x>.
- Nehring, Ina, Tanja Kostka, Rüdiger von Kries, et Eva A Rehfuess. 2015. « Impacts of In Utero and Early Infant Taste Experiences on Later Taste Acceptance: A Systematic Review ». *The Journal of Nutrition* 145 (6): 1271-79. <https://doi.org/10.3945/jn.114.203976>.
- Nelissen, E. C. M., A. P. A. van Montfoort, J. C. M. Dumoulin, et J. L. H. Evers. 2011. « Epigenetics and the Placenta ». *Human Reproduction Update* 17 (3): 397-417. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq052>.
- Newman, John C., et Eric Verdin. 2017. «  $\beta$ -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite ». *Annual Review of Nutrition* 37 (1): 51-76. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064916>.
- Ng, Marie, Tom Fleming, Margaret Robinson, Blake Thomson, Nicholas Graetz, Christopher Margono, Erin C Mullany, et al. 2014. « Global, Regional, and National Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adults during 1980–2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 ». *The Lancet* 384 (9945): 766-81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).
- Nguyen, P., V. Leray, M. Diez, S. Serisier, J. Le Bloc'h, B. Siliart, et H. Dumon. 2008. « Liver Lipid Metabolism ». *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 (3): 272-83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>.
- Nicholas, L M, J L Morrison, L Rattanaray, S Zhang, S E Ozanne, et I C McMillen. 2016. « The Early Origins of Obesity and Insulin Resistance: Timing, Programming and Mechanisms ». *International Journal of Obesity* 40 (2): 229-38. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.178>.
- Nicholas, Lisa M., Leewen Rattanaray, Janna L. Morrison, David O. Kleemann, Simon K. Walker, Song Zhang, Severence MacLaughlin, et I. Caroline McMillen. 2014. « Maternal Obesity or Weight Loss around Conception Impacts Hepatic Fatty Acid Metabolism in the Offspring: Maternal Obesity and Hepatic Metabolism ». *Obesity* 22 (7): 1685-93. <https://doi.org/10.1002/oby.20752>.
- Nicklaus, Sophie. 2016. « The Role of Food Experiences during Early Childhood in Food Pleasure Learning ». *Appetite* 104 (septembre): 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.08.022>.
- Nicolaïdis, Stylianos. 2008. « Prenatal Imprinting of Postnatal Specific Appetites and Feeding Behavior ». *Metabolism* 57 (octobre): S22-26. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.07.004>.
- Nie, Litong, Lin Shuai, Mingrui Zhu, Ping Liu, Zhi-Fu Xie, Shangwen Jiang, Hao-Wen Jiang, et al. 2017. « The Landscape of Histone Modifications in a High-Fat Diet-Induced Obese (DIO) Mouse Model ». *Molecular & Cellular Proteomics* 16 (7): 1324-34. <https://doi.org/10.1074/mcp.M117.067553>.

- Oben, Jude A., Angelina Mouralidarane, Anne-Maj Samuelsson, Phillippa J. Matthews, Maelle L. Morgan, Chad Mckee, Junpei Soeda, et al. 2010. « Maternal Obesity during Pregnancy and Lactation Programs the Development of Offspring Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice ». *Journal of Hepatology* 52 (6): 913-20. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.042>.
- ObEpi. 2012. « Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité ».
- Oden, Jon, et William R. Treem. 2003. « Inborn errors of fasting adaptation ». In *Nutrition in Pediatrics - Basic Science and Clinical Applications*, 3rd., 591-608. BC Decker Inc. <https://the-eye.eu/public/Books/BioMed/Nutrition%20in%20Pediatrics%20-%20Basic%20Sci.%20and%20Clin.%20Applns.%203rd%20ed.%20-%20W.%20Walker%2C%20et.%20al.%2C%20%28B%20C%20Decker%2C%202003%29%20WWW.pdf>.
- OMS. 2018. « Obésité et surpoids ». <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- O'Neill, S., et L. O'Driscoll. 2015. « Metabolic Syndrome: A Closer Look at the Growing Epidemic and Its Associated Pathologies: Metabolic Syndrome ». *Obesity Reviews* 16 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1111/obr.12229>.
- Ontko, A, et D. B. Zilversmit. 1967. « Metabolism of Chylomicrons by the Isolated Rat Liver ». *Journal of Lipid Research*, n° 8: 90-96.
- Oosterveer, Maaïke H., et Kristina Schoonjans. 2014. « Hepatic Glucose Sensing and Integrative Pathways in the Liver ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (8): 1453-67. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1505-z>.
- Ornellas, Fernanda, Priscila V. Carapeto, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda, et Marcia B. Aguila. 2017. « Obese Fathers Lead to an Altered Metabolism and Obesity in Their Children in Adulthood: Review of Experimental and Human Studies ». *Jornal de Pediatria* 93 (6): 551-59. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.02.004>.
- Outrequin, Gérard, et Bertrand Boutillier. 2007. « Neuro-Anatomie Fonctionnelle ». <https://www.anatomie-humaine.com/-Neuro-Anatomie-fonctionnelle-.html>.
- Paauw, N. D., A. T. Lely, J. A. Joles, A. Franx, P. G. Nikkels, M. Mokry, et B. B. van Rijn. 2018. « H3K27 Acetylation and Gene Expression Analysis Reveals Differences in Placental Chromatin Activity in Fetal Growth Restriction ». *Clinical Epigenetics* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0508-x>.
- Padilla, Stephanie L, Jill S Carmody, et Lori M Zeltser. 2010. « Pomc-Expressing Progenitors Give Rise to Antagonistic Neuronal Populations in Hypothalamic Feeding Circuits ». *Nature Medicine* 16 (4): 403-5. <https://doi.org/10.1038/nm.2126>.
- Page, Kathleen C., Raleigh E. Malik, Joshua A. Ripple, et Endla K. Anday. 2009. « Maternal and Postweaning Diet Interaction Alters Hypothalamic Gene Expression and Modulates Response to a High-Fat Diet in Male Offspring ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297 (4): R1049-57. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90585.2008>.
- Palouzier-Paulignan, B., M.-C. Lacroix, P. Aime, C. Baly, M. Caillol, P. Congar, A. K. Julliard, K. Tucker, et D. A. Fadool. 2012. « Olfaction Under Metabolic Influences ». *Chemical Senses* 37 (9): 769-97. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs059>.
- Panchenko, Polina E., Marie-Christine Lacroix, Mélanie Jouin, Sarah Voisin, Karine Badonnel, Marion Lemaire, Nicolas Meunier, et al. 2019. « Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice ». *Nutrients* 11 (5): 948. <https://doi.org/10.3390/nu11050948>.
- Panchenko, Polina E., Sarah Voisin, Mélanie Jouin, Luc Jouneau, Audrey Prézélin, Simon Lecoutre, Christophe Breton, Hélène Jammes, Claudine Junien, et Anne Gabory. 2016. « Expression of Epigenetic Machinery Genes Is Sensitive to Maternal Obesity and Weight Loss in Relation to Fetal Growth in Mice ». *Clinical Epigenetics* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0188-3>.
- Papes, Fabio, Marcelo J. Surpili, Francesco Langone, Jose R. Trigo, et Paulo Arruda. 2001. « The Essential Amino Acid Lysine Acts as Precursor of Glutamate in the Mammalian Central Nervous System ». *FEBS Letters* 488 (1-2): 34-38. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02401-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02401-7).
- Park, Sunmin, Da Sol Kim, et James W. Daily. 2011. « Central Infusion of Ketone Bodies Modulates Body Weight and Hepatic Insulin Sensitivity by Modifying Hypothalamic Leptin and Insulin Signaling Pathways in Type 2 Diabetic Rats ». *Brain Research* 1401 (juillet): 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.040>.

- Pathil, Anita, Gerhard Liebisch, Jürgen G. Okun, Walee Chamulitrat, Gerd Schmitz, et Wolfgang Stremmel. 2015. « Ursodeoxycholyly Lysophosphatidylethanolamide Modifies Aberrant Lipid Profiles in NAFLD ». *European Journal of Clinical Investigation* 45 (9): 925-31. <https://doi.org/10.1111/eci.12486>.
- Pedroso, Amanda P., Ana P. S. Dornellas, Adriana P. de Souza, Josias F. Pagotto, Lila M. Oyama, Cláudia M. O. Nascimento, Jelena Klawitter, Uwe Christians, Alexandre K. Tashima, et Eliane Beraldi Ribeiro. 2018. « A Proteomics–Metabolomics Approach Indicates Changes in Hypothalamic Glutamate–GABA Metabolism of Adult Female Rats Submitted to Intrauterine Growth Restriction ». *European Journal of Nutrition*, novembre. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1851-6>.
- Pedroso, Amanda P., Adriana P. Souza, Ana P. S. Dornellas, Lila M. Oyama, Cláudia M. O. Nascimento, Gianni M. S. Santos, José C. Rosa, et al. 2017. « Intrauterine Growth Restriction Programs the Hypothalamus of Adult Male Rats: Integrated Analysis of Proteomic and Metabolomic Data ». *Journal of Proteome Research* 16 (4): 1515-25. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00923>.
- Peleg-Raibstein, D, G Sarker, K Litwan, S D Krämer, S M Ametamey, R Schibli, et C Wolfrum. 2016. « Enhanced Sensitivity to Drugs of Abuse and Palatable Foods Following Maternal Overnutrition ». *Translational Psychiatry* 6 (10): e911-e911. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.176>.
- Peleg-Raibstein, Daria, Edlira Luca, et Christian Wolfrum. 2012. « Maternal High-Fat Diet in Mice Programs Emotional Behavior in Adulthood ». *Behavioural Brain Research* 233 (2): 398-404. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.027>.
- Peng, Mei, Duncan Coutts, Ting Wang, et Yusuf O. Cakmak. 2019. « Systematic Review of Olfactory Shifts Related to Obesity ». *Obesity Reviews* 20 (2): 325-38. <https://doi.org/10.1111/obr.12800>.
- Penney, N C, J Kinross, R C Newton, et S Purkayastha. 2015. « The Role of Bile Acids in Reducing the Metabolic Complications of Obesity after Bariatric Surgery: A Systematic Review ». *International Journal of Obesity* 39 (11): 1565-74. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.115>.
- Pirola, Luciano, et José Candido Ferraz. 2017. « Role of Pro- and Anti-Inflammatory Phenomena in the Physiopathology of Type 2 Diabetes and Obesity ». *World Journal of Biological Chemistry* 8 (2): 120. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i2.120>.
- Plata, Maria, Lyda Williams, Yoshinori Seki, Kirsten Hartil, Harpreet Kaur, Chia-Lei Lin, Ariana Fiallo, et al. 2014. « Critical Periods of Increased Fetal Vulnerability to a Maternal High Fat Diet ». *Reproductive Biology and Endocrinology* 12 (1): 80. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-80>.
- Pogribny, Igor P., Volodymyr P. Tryndyak, Tetyana V. Bagnyukova, Stepan Melnyk, Beverly Montgomery, Sharon A. Ross, John R. Latendresse, Ivan Rusyn, et Frederick A. Beland. 2009. « Hepatic Epigenetic Phenotype Predetermines Individual Susceptibility to Hepatic Steatosis in Mice Fed a Lipogenic Methyl-Deficient Diet ». *Journal of Hepatology* 51 (1): 176-86. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.021>.
- Posont, Robert J., et Dustin T. Yates. 2019. « Postnatal Nutrient Repartitioning Due to Adaptive Developmental Programming ». *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 35 (2): 277-88. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.02.001>.
- Poston, Lucilla. 2012. « Maternal Obesity, Gestational Weight Gain and Diet as Determinants of Offspring Long Term Health ». *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26 (5): 627-39. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.03.010>.
- Preidis, Geoffrey A., Mignon A. Keaton, Philippe M. Campeau, Brooke C. Bessard, Margaret E. Conner, et Peter J. Hotez. 2014. « The Undernourished Neonatal Mouse Metabolome Reveals Evidence of Liver and Biliary Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress ». *The Journal of Nutrition* 144 (3): 273-81. <https://doi.org/10.3945/jn.113.183731>.
- Price, Sarah, Alison Nankervis, Michael Permezel, Luke Prendergast, Priya Sumithran, et Joseph Proietto. 2018. « Health Consequences for Mother and Baby of Substantial Pre-Conception Weight Loss in Obese Women: Study Protocol for a Randomized Controlled Trial ». *Trials* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s13063-018-2615-6>.
- Primeaux, S, M Barnes, et G Bray. 2007. « Olfactory Bulbectomy Increases Food Intake and Hypothalamic Neuropeptide Y in Obesity-Prone but Not Obesity-Resistant Rats ». *Behavioural Brain Research* 180 (2): 190-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.005>.
- Prud'homme, M.J., M.C. Lacroix, K. Badonnel, S. Gougis, C. Baly, R. Salesse, et M. Caillol. 2009. « Nutritional Status Modulates Behavioural and Olfactory Bulb Fos Responses to Isoamyl Acetate or Food Odour in Rats: Roles of Orexins and Leptin ». *Neuroscience* 162 (4): 1287-98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.043>.

- Pruis, M. G. M., á. Lendvai, V. W. Bloks, M. V. Zwier, J. F. W. Baller, A. de Bruin, A. K. Groen, et T. Plösch. 2014. « Maternal Western Diet Primes Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Adult Mouse Offspring ». *Acta Physiologica* 210 (1): 215-27. <https://doi.org/10.1111/apha.12197>.
- Purushotham, Aparna, Thaddeus T. Schug, Qing Xu, Sailesh Surapureddi, Xiumei Guo, et Xiaoling Li. 2009. « Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation ». *Cell Metabolism* 9 (4): 327-38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.006>.
- Rajasingam, Daghni, Paul T. Seed, Annette L. Briley, Andrew H. Shennan, et Lucilla Poston. 2009. « A Prospective Study of Pregnancy Outcome and Biomarkers of Oxidative Stress in Nulliparous Obese Women ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 200 (4): 395.e1-395.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.10.047>.
- Ramírez-López, María Teresa, Mariam Vázquez, Ermelinda Lomazzo, Clementine Hofmann, Rosario Noemi Blanco, Francisco Alén, María Antón, et al. 2017. « A Moderate Diet Restriction during Pregnancy Alters the Levels of Endocannabinoids and Endocannabinoid-Related Lipids in the Hypothalamus, Hippocampus and Olfactory Bulb of Rat Offspring in a Sex-Specific Manner ». Édité par Cristina Óvilo. *PLOS ONE* 12 (3): e0174307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307>.
- Rattanatrav, L., S. M. MacLaughlin, D. O. Kleemann, S. K. Walker, B. S. Muhlhausler, et I. C. McMillen. 2010. « Impact of Maternal Periconceptional Overnutrition on Fat Mass and Expression of Adipogenic and Lipogenic Genes in Visceral and Subcutaneous Fat Depots in the Postnatal Lamb ». *Endocrinology* 151 (11): 5195-5205. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0501>.
- Rauschert, Sebastian, Franca F. Kirchberg, Linda Marchioro, Berthold Koletzko, Christian Hellmuth, et Olaf Uhl. 2017. « Early Programming of Obesity Throughout the Life Course: A Metabolomics Perspective ». *Annals of Nutrition and Metabolism* 70 (3): 201-9. <https://doi.org/10.1159/000459635>.
- Ravelli, Anita CJ, Jan HP van der Meulen, Clive Osmond, David JP Barker, et Otto P Bleker. 1999. « Obesity at the Age of 50 y in Men and Women Exposed to Famine Prenatally ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 70 (5): 811-16. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.5.811>.
- Raychaudhuri, Nupur, Santanu Raychaudhuri, Manikkavasagar Thamocharan, et Sherin U. Devaskar. 2008. « Histone Code Modifications Repress Glucose Transporter 4 Expression in the Intrauterine Growth-Restricted Offspring ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (20): 13611-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800128200>.
- Raynaud, Aurélien, Nicolas Meunier, Adrien Acquistapace, et Vincent Bombail. 2015. « Chronic Variable Stress Exposure in Male Wistar Rats Affects the First Step of Olfactory Detection ». *Behavioural Brain Research* 291 (septembre): 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.013>.
- Reynolds, Clare M., Stephanie A. Segovia, et Mark H. Vickers. 2017. « Experimental Models of Maternal Obesity and Neuroendocrine Programming of Metabolic Disorders in Offspring ». *Frontiers in Endocrinology* 8 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00245>.
- Rho, Jong M., Li-Rong Shao, et Carl E. Stafstrom. 2019. « 2-Deoxyglucose and Beta-Hydroxybutyrate: Metabolic Agents for Seizure Control ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13 (avril). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00172>.
- Ribaroff, G. A., E. Wastnedge, A. J. Drake, R. M. Sharpe, et T. J. G. Chambers. 2017. « Animal Models of Maternal High Fat Diet Exposure and Effects on Metabolism in Offspring: A Meta-Regression Analysis: Maternal HFD and Offspring Metabolism ». *Obesity Reviews* 18 (6): 673-86. <https://doi.org/10.1111/obr.12524>.
- Riera, Celine E., Eva Tsaousidou, Jonathan Halloran, Patricia Follett, Oliver Hahn, Mafalda M.A. Pereira, Linda Engström Ruud, et al. 2017. « The Sense of Smell Impacts Metabolic Health and Obesity ». *Cell Metabolism* 26 (1): 198-211.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.015>.
- Rincel, Marion, Amandine Lépinay, Anne Gabory, Vassilia Théodorou, Muriel Koehl, Valérie Daugé, Stefania Maccari, et Muriel Darnaudéry. 2016. « Environnement précoce et vulnérabilité neuropsychiatrique ». *médecine/sciences* 32 (1): 93-99. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201015>.
- Rivera, Heidi M., Kelly J. Christiansen, et Elinor L. Sullivan. 2015. « The Role of Maternal Obesity in the Risk of Neuropsychiatric Disorders ». *Frontiers in Neuroscience* 9 (juin). <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00194>.
- Rodriguez, J.S., G.L. Rodríguez-González, L.A. Reyes-Castro, C. Ibáñez, A. Ramírez, R. Chavira, F. Larrea, P.W. Nathanielsz, et E. Zambrano. 2012. « Maternal Obesity in the Rat Programs Male Offspring Exploratory, Learning and Motivation Behavior: Prevention by Dietary Intervention Pre-Gestation or in Gestation ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 30 (2): 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.12.012>.

- Rojas-Morales, Pedro, Edilia Tapia, et José Pedraza-Chaverri. 2016. «  $\beta$ -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite in Starvation Response? » *Cellular Signalling* 28 (8): 917-23. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.04.005>.
- Roseboom, Tessa J., Rebecca C. Painter, Annet F.M. van Abeelen, Marjolein V.E. Veenendaal, et Susanne R. de Rooij. 2011. « Hungry in the Womb: What Are the Consequences? Lessons from the Dutch Famine ». *Maturitas* 70 (2): 141-45. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.06.017>.
- Rousseau-Ralliard, Delphine, Anne Couturier-Tarrade, René Thieme, Roselyne Brat, Audrey Rolland, Pascal Boileau, Marie-Christine Aubrière, et al. 2019. « A Short Periconceptional Exposure to Maternal Type-1 Diabetes Is Sufficient to Disrupt the Feto-Placental Phenotype in a Rabbit Model ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 480 (janvier): 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.10.010>.
- Roy, Maggie, Marie Hennebelle, Valérie St-Pierre, Alexandre Courchesne-Loyer, Mélanie Fortier, Anne-Karine Bouzier-Sore, Jean-Louis Gallis, Marie-Christine Beauvieux, et Stephen C. Cunnane. 2013. « Long-Term Calorie Restriction Has Minimal Impact on Brain Metabolite and Fatty Acid Profiles in Aged Rats on a Western-Style Diet ». *Neurochemistry International* 63 (5): 450-57. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.08.006>.
- Ruchat, Stephanie-May, Andrée-Anne Houde, Grégory Voisin, Julie St-Pierre, Patrice Perron, Jean-Patrice Baillargeon, Daniel Gaudet, Marie-France Hivert, Diane Brisson, et Luigi Bouchard. 2013. « Gestational Diabetes Mellitus Epigenetically Affects Genes Predominantly Involved in Metabolic Diseases ». *Epigenetics* 8 (9): 935-43. <https://doi.org/10.4161/epi.25578>.
- Ruebel, Meghan L., Matthew Cotter, Clark R. Sims, Dean M. Moutos, Thomas M. Badger, Mario A. Cleves, Kartik Shankar, et Aline Andres. 2017. « Obesity Modulates Inflammation and Lipid Metabolism Oocyte Gene Expression: A Single-Cell Transcriptome Perspective ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102 (6): 2029-38. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3524>.
- Ruebner, Boris H., Tikoes A. Blankenberg, Deborah A. Burrows, Wilson Soohoo, et Judi K. Lund. 1990. « Development and transformation of the ductal plate in the developing human liver ». *Pediatric pathology* 10 (1-2): 55-68.
- Rui, Liangyou. 2014. « Energy Metabolism in the Liver ». In *Comprehensive Physiology*, édité par Ronald Terjung, 177-97. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>.
- Rutkowsky, Jennifer M., Linda L. Lee, Michelle Puchowicz, Mari S. Golub, Douglas E. Befroy, Dennis W. Wilson, Steven Anderson, et al. 2018. « Reduced Cognitive Function, Increased Blood-Brain-Barrier Transport and Inflammatory Responses, and Altered Brain Metabolites in LDLr<sup>-/-</sup> and C57BL/6 Mice Fed a Western Diet ». Édité par Mária A. Deli. *PLOS ONE* 13 (2): e0191909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191909>.
- Sanders, Tessa R., Dong Won Kim, Kelly A. Glendining, et Christine L. Jasoni. 2014. « Maternal Obesity and IL-6 Lead to Aberrant Developmental Gene Expression and Deregulated Neurite Growth in the Fetal Arcuate Nucleus ». *Endocrinology* 155 (7): 2566-77. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1968>.
- Sarker, Gitalee, et Daria Peleg-Raibstein. 2018. « Maternal Overnutrition Induces Long-Term Cognitive Deficits across Several Generations ». *Nutrients* 11 (1): 7. <https://doi.org/10.3390/nu11010007>.
- Sarnat, Harvey B., Laura Flores-Sarnat, et Xing-Chang Wei. 2017. « Olfactory Development, Part 1: Function, From Fetal Perception to Adult Wine-Tasting ». *Journal of Child Neurology* 32 (6): 566-78. <https://doi.org/10.1177/0883073817690867>.
- Sarnat, Harvey B., et Weiming Yu. 2016. « Maturation and Dysgenesis of the Human Olfactory Bulb: Olfactory Bulb ». *Brain Pathology* 26 (3): 301-18. <https://doi.org/10.1111/bpa.12275>.
- Sasaki, Kazunobu, et Yuji Sonoda. 2000. « Histometrical and three-dimension analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo ». *Architectural histology and cytology*.
- Sato, Noriko, Katsuko Sudo, Masayo Mori, Chihiro Imai, Masaaki Muramatsu, et Masahiro Sugimoto. 2017. « Early Gestational Maternal Low-Protein Diet Diminishes Hepatic Response to Fasting in Young Adult Male Mice ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10380-4>.
- Schaal, Benoist, Luc Marlier, et Robert Soussignan. 1995. « Responsibness to the Odour of Amniotic Fluid in the Human Neonate ». *Biol Neonate*, n° 67: 397-406.
- Schulz, L. C. 2010. « The Dutch Hunger Winter and the Developmental Origins of Health and Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (39): 16757-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012911107>.
- Sébédio, Jean-Louis, et Estelle Pujos-Guillot. 2009. « La métabolomique : une nouvelle approche pour évaluer l'effet santé des aliments », 8.



- Selvin, E., A. M. Rawlings, M. Grams, R. Klein, M. Steffes, et J. Coresh. 2014. « Association of 1,5-Anhydroglucitol with Diabetes and Microvascular Conditions ». *Clinical Chemistry* 60 (11): 1409-18. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.229427>.
- Sferruzzi-Perri, Amanda N., et Emily J. Camm. 2016. « The Programming Power of the Placenta ». *Frontiers in Physiology* 7 (mars). <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00033>.
- Shechter, David, Holger L Dormann, C David Allis, et Sandra B Hake. 2007. « Extraction, purification and analysis of histones ». *Nature Protocols* 2 (6): 1445-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.202>.
- Shimazu, T., M. D. Hirschey, J. Newman, W. He, K. Shirakawa, N. Le Moan, C. A. Grueter, et al. 2013. « Suppression of Oxidative Stress by  $\beta$ -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor ». *Science* 339 (6116): 211-14. <https://doi.org/10.1126/science.1227166>.
- Showalter, Megan R., Eric B. Nonnecke, A. L. Linderholm, Tomas Cajka, Michael R. Sa, Bo Lönnerdal, Nicholas J. Kenyon, et Oliver Fiehn. 2018. « Obesogenic Diets Alter Metabolism in Mice ». Édité par Albert J. Fornace. *PLOS ONE* 13 (1): e0190632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190632>.
- Skaznik-Wikiel, Malgorzata E, Delaney C Swindle, Amanda A Allshouse, Alex J Polotsky, et L McManaman. 2016. « High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice », 10.
- Sleiman, Sama F., Jeffrey Henry, Rami Al-Haddad, Laretta El Hayek, Edwina Abou Haidar, Thomas Stringer, Devyani Ulja, Saravanan S. Karuppagounder, Edward B. Holson, et Rajiv R. Ratan. 2016. « Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate ». *Elife* 5: e15092.
- Smith, J., K. Cianflone, S. Biron, F. S. Hould, S. Lebel, S. Marceau, O. Lescelleur, et al. 2009. « Effects of Maternal Surgical Weight Loss in Mothers on Intergenerational Transmission of Obesity ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94 (11): 4275-83. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0709>.
- Sollars, Patricia J., et Gary E. Pickard. 2015. « The Neurobiology of Circadian Rhythms ». *Psychiatric Clinics of North America* 38 (4): 645-65. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2015.07.003>.
- Soltis, Anthony R., Norman J. Kennedy, Xiaofeng Xin, Feng Zhou, Scott B. Ficarro, Yoon Sing Yap, Bryan J. Matthews, et al. 2017. « Hepatic Dysfunction Caused by Consumption of a High-Fat Diet ». *Cell Reports* 21 (11): 3317-28. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.059>.
- Song, Cai, et Brian E. Leonard. 2005. « The Olfactory Bulbectomised Rat as a Model of Depression ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29 (4-5): 627-47. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.010>.
- Song, Ye, Yang Yu, Dongjuan Wang, Shuiqin Chai, Dan Liu, Xiaoqiu Xiao, et Ying Huang. 2015. « Maternal High-Fat Diet Feeding during Pregnancy and Lactation Augments Lung Inflammation and Remodeling in the Offspring ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 207 (février): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.003>.
- Sookoian, Silvia, et Carlos J. Pirola. 2013. « Systems Biology Elucidates Common Pathogenic Mechanisms between Nonalcoholic and Alcoholic-Fatty Liver Disease ». Édité par Christina Chan. *PLoS ONE* 8 (3): e58895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058895>.
- Sookoian, Silvia, Maria Soledad Rosselli, Carolina Gemma, Adriana L. Burgueño, Tomas Fernández Gianotti, Gustavo O. Castaño, et Carlos J. Pirola. 2010. « Epigenetic Regulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Impact of Liver Methylation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  Promoter ». *Hepatology* 52 (6): 1992-2000. <https://doi.org/10.1002/hep.23927>.
- Spencer, Alice, L Corman, et J M Lowenstein. 1964. « Citrate and the Conversion of Carbohydrate into Fat ». *Biochemical Journal* 93: 378-88.
- Stiles, Joan, et Terry L. Jernigan. 2010. « The Basics of Brain Development ». *Neuropsychology Review* 20 (4): 327-48. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>.
- Sullivan, E. L., B. Grayson, D. Takahashi, N. Robertson, A. Maier, C. L. Bethea, M. S. Smith, K. Coleman, et K. L. Grove. 2010. « Chronic Consumption of a High-Fat Diet during Pregnancy Causes Perturbations in the Serotonergic System and Increased Anxiety-Like Behavior in Nonhuman Primate Offspring ». *Journal of Neuroscience* 30 (10): 3826-30. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5560-09.2010>.
- Sullivan, E. L., Kellie M. Riper, Rachel Lockard, et Jeanette C. Valteau. 2015. « Maternal High-Fat Diet Programming of the Neuroendocrine System and Behavior ». *Hormones and Behavior* 76 (novembre): 153-61. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.008>.
- Sullivan, Elinor L., Heidi M. Rivera, Cadence A. True, Juliana G. Franco, Karalee Baquero, Tyler A. Dean, Jeanette C. Valteau, et al. 2017. « Maternal and Postnatal High-Fat Diet Consumption Programs Energy Balance

- and Hypothalamic Melanocortin Signaling in Nonhuman Primate Offspring ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 313 (2): R169-79. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00309.2016>.
- Sun, B., R. H. Purcell, C. E. Terrillion, J. Yan, T. H. Moran, et K. L. K. Tamashiro. 2012. « Maternal High-Fat Diet During Gestation or Suckling Differentially Affects Offspring Leptin Sensitivity and Obesity ». *Diabetes* 61 (11): 2833-41. <https://doi.org/10.2337/db11-0957>.
- Suter, Melissa A., Aishe Chen, Marie S. Burdine, Mahua Choudhury, R. Alan Harris, Robert H. Lane, Jacob E. Friedman, Kevin L. Grove, Alan J. Tackett, et Kjersti M. Aagaard. 2012. « A Maternal High-Fat Diet Modulates Fetal SIRT1 Histone and Protein Deacetylase Activity in Nonhuman Primates ». *The FASEB Journal* 26 (12): 5106-14. <https://doi.org/10.1096/fj.12-212878>.
- Suter, Melissa A., Jun Ma, Patricia M. Vuguin, Kirsten Hartil, Ariana Fiallo, R. Alan Harris, Maureen J. Charron, et Kjersti M. Aagaard. 2014. « In Utero Exposure to a Maternal High-Fat Diet Alters the Epigenetic Histone Code in a Murine Model ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 210 (5): 463.e1-463.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.01.045>.
- Tabachnik, Tzliil, Tatiana Kisliouk, Asaf Marco, Noam Meiri, et Aron Weller. 2017. « Thyroid Hormone-Dependent Epigenetic Regulation of Melanocortin 4 Receptor Levels in Female Offspring of Obese Rats ». *Endocrinology* 158 (4): 842-51. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1854>.
- Takahashi, Hidekazu, J. Michael McCaffery, Rafael A. Irizarry, et Jef D. Boeke. 2006. « Nucleocytosolic Acetyl-Coenzyme A Synthetase Is Required for Histone Acetylation and Global Transcription ». *Molecular Cell* 23 (2): 207-17. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.040>.
- Takemura, Shigekazu, Hideki Azuma, Mayuko Osada-Oka, Shoji Kubo, Toshihiko Shibata, et Yukiko Minamiyama. 2018. « S-Allyl-Glutathione Improves Experimental Liver Fibrosis by Regulating Kupffer Cell Activation in Rats ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 314 (2): G150-63. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00023.2017>.
- Taouk, L., et J. Schulkun. 2016. « Transgenerational Transmission of Pregestational and Prenatal Experience: Maternal Adversity, Enrichment, and Underlying Epigenetic and Environmental Mechanisms ». *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 7 (6): 588-601. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000416>.
- Tarrade, Anne, Delphine Rousseau-Ralliard, Marie-Christine Aubrière, Nathalie Peynot, Michèle Dahirel, Justine Bertrand-Michel, Tiphaine Aguirre-Lavin, et al. 2013. « Sexual Dimorphism of the Feto-Placental Phenotype in Response to a High Fat and Control Maternal Diets in a Rabbit Model ». Édité par Ana Claudia Zenclussen. *PLoS ONE* 8 (12): e83458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083458>.
- Taylor, P. D., et L. Poston. 2007. « Developmental Programming of Obesity in Mammals: Developmental Programming of Obesity ». *Experimental Physiology* 92 (2): 287-98. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.032854>.
- Thiebaud, N., M. C. Johnson, J. L. Butler, G. A. Bell, K. L. Ferguson, A. R. Fadool, J. C. Fadool, A. M. Gale, D. S. Gale, et D. A. Fadool. 2014. « Hyperlipidemic Diet Causes Loss of Olfactory Sensory Neurons, Reduces Olfactory Discrimination, and Disrupts Odor-Reversal Learning ». *Journal of Neuroscience* 34 (20): 6970-84. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3366-13.2014>.
- Thompson, Amanda L. 2013. « Intergenerational Impact of Maternal Obesity and Postnatal Feeding Practices on Pediatric Obesity ». *Nutrition Reviews* 71 (octobre): S55-61. <https://doi.org/10.1111/nure.12054>.
- Thompson, Jacqueline R., Jeanette C. Valteau, Ashley N. Barling, Juliana G. Franco, Madison DeCapo, Jennifer L. Bagley, et Elinor L. Sullivan. 2017. « Exposure to a High-Fat Diet during Early Development Programs Behavior and Impairs the Central Serotonergic System in Juvenile Non-Human Primates ». *Frontiers in Endocrinology* 8 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00164>.
- Tian, Yuan, Vincent Wai-Sun Wong, Henry Lik-Yuen Chan, et Alfred Sze-Lok Cheng. 2013. « Epigenetic Regulation of Hepatocellular Carcinoma in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Seminars in Cancer Biology* 23 (6): 471-82. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.010>.
- Tibana, Ramires, Octávio Franco, Rinaldo Pereira, James Navalta, et Jonato Prestes. 2017. « Exercise as an Effective Transgenerational Strategy to Overcome Metabolic Syndrome in the Future Generation: Are We There? ». *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 125 (06): 347-52. <https://doi.org/10.1055/s-0042-120538>.
- Tilson, Hugh A. 1998. « Developmental Neurotoxicology of Endocrine Disruptors and Pesticides: Identification of Information Gaps and Research Needs ». *Environmental Health Perspectives* 106: 5.
- Tiraby, Claire, et Dominique Langin. 2005. « PGC-1 $\alpha$ , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme ». *médecine/sciences* 21 (1): 49-54. <https://doi.org/10.1051/medsci/200521149>.

- Todrank, J., G. Heth, et D. Restrepo. 2011. « Effects of in Utero Odorant Exposure on Neuroanatomical Development of the Olfactory Bulb and Odour Preferences ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1714): 1949-55. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2314>.
- Tong, J., E. Mannea, P. Aime, P. T. Pfluger, C.-X. Yi, T. R. Castaneda, H. W. Davis, et al. 2011. « Ghrelin Enhances Olfactory Sensitivity and Exploratory Sniffing in Rodents and Humans ». *Journal of Neuroscience* 31 (15): 5841-46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5680-10.2011>.
- Trefts, Elijah, Maureen Gannon, et David H. Wasserman. 2017. « The Liver ». *Current Biology* 27 (21): R1147-51. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.
- Tremblay, Kimberly D., et Kenneth S. Zaret. 2005. « Distinct Populations of Endoderm Cells Converge to Generate the Embryonic Liver Bud and Ventral Foregut Tissues ». *Developmental Biology* 280 (1): 87-99. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.003>.
- Tu, Lan N., Megan R. Showalter, Tomas Cajka, Sili Fan, Viju V. Pillai, Oliver Fiehn, et Vimal Selvaraj. 2017. « Metabolomic Characteristics of Cholesterol-Induced Non-Obese Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05040-6>.
- Tuersunjiang, Nuermaiti, John F. Odhiambo, Nathan M. Long, Desiree R. Shasa, Peter W. Nathanielsz, et Stephen P. Ford. 2013. « Diet Reduction to Requirements in Obese/Overfed Ewes from Early Gestation Prevents Glucose/Insulin Dysregulation and Returns Fetal Adiposity and Organ Development to Control Levels ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 305 (7): E868-78. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00117.2013>.
- Tzschentke, Barbara, Semjon Bogatyrev, Karen Schellong, Rebecca C. Rancourt, et Andreas Plagemann. 2015. « Temporary Prenatal Hyperglycemia Leads to Postnatal Neuronal 'Glucose-Resistance' in the Chicken Hypothalamus ». *Brain Research* 1618 (août): 231-40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.05.037>.
- United Nations, DESA / Population Division. 2017. « World Population Prospects 2017 ». <https://population.un.org/>.
- Upadhyay, Jagriti, Olivia Farr, Nikolaos Perakakis, Wael Ghaly, et Christos Mantzoros. 2018. « Obesity as a Disease ». *Medical Clinics of North America* 102 (1): 13-33. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.004>.
- Upadhyaya, Bijaya, Tricia Larsen, Shivon Barwari, Eli Louwagie, Michelle Baack, et Moul Dey. 2017. « Prenatal Exposure to a Maternal High-Fat Diet Affects Histone Modification of Cardiometabolic Genes in Newborn Rats ». *Nutrients* 9 (4): 407. <https://doi.org/10.3390/nu9040407>.
- Valle-Leija, Pablo. 2015. « Odorant Receptors Signaling Instructs the Development and Plasticity of the Glomerular Map ». *Neural Plasticity* 2015: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/975367>.
- Van Vuuren, Michele A. Janse, Esben Strodl, Katherine M. White, et Philip David Lockie. 2017. « Taste, Enjoyment, and Desire of Flavors Change After Sleeve Gastrectomy-Short Term Results ». *Obesity Surgery* 27 (6): 1466-73. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2497-1>.
- Ventura, Alison K., et John Worobey. 2013. « Early Influences on the Development of Food Preferences ». *Current Biology* 23 (9): R401-8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.037>.
- Verdot, Charlotte. 2017. « CORPULENCE DES ENFANTS ET DES ADULTES EN FRANCE MÉTROPOLITAINE EN 2015. RÉSULTATS DE L'ÉTUDE ESTEBAN ET ÉVOLUTION DEPUIS 2006 / CHILDREN AND ADULTS BODY MASS INDEX IN FRANCE IN 2015. RESULTS OF THE ESTEBAN STUDY AND TRENDS », 8.
- Villamor, Eduardo, et Sven Cnattingius. 2006. « Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study ». *The Lancet* 368 (9542): 1164-1170.
- Voerman, Ellis, Susana Santos, Bernadeta Patro Golab, Pilar Amiano, Ferran Ballester, Henrique Barros, Anna Bergström, et al. 2019. « Maternal Body Mass Index, Gestational Weight Gain, and the Risk of Overweight and Obesity across Childhood: An Individual Participant Data Meta-Analysis ». Édité par Ronald C. W. Ma. *PLOS Medicine* 16 (2): e1002744. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002744>.
- Vogt, Merly C., Lars Paeger, Simon Hess, Sophie M. Steculorum, Motoharu Awazawa, Brigitte Hampel, Susanne Neupert, et al. 2014. « Neonatal Insulin Action Impairs Hypothalamic Neurocircuit Formation in Response to Maternal High-Fat Feeding ». *Cell* 156 (3): 495-509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.008>.
- Vucetic, Zivjena, Jessica Kimmel, Kathy Totoki, Emily Hollenbeck, et Teresa M. Reyes. 2010. « Maternal High-Fat Diet Alters Methylation and Gene Expression of Dopamine and Opioid-Related Genes ». *Endocrinology* 151 (10): 4756-64. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0505>.
- Wagner, Sandra, Sylvie Issanchou, Claire Chabanet, Christine Lange, Benoist Schaal, et Sandrine Monnery-Patris. 2019. « Weanling Infants Prefer the Odors of Green Vegetables, Cheese, and Fish When Their

- Mothers Consumed These Foods During Pregnancy and/or Lactation ». *Chemical Senses* 44 (4): 257-65. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjz011>.
- Wankhade, Umesh D., Keshari M. Thakali, et Kartik Shankar. 2016. « Persistent Influence of Maternal Obesity on Offspring Health: Mechanisms from Animal Models and Clinical Studies ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 435 (novembre): 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.001>.
- Warner, Matthew J., et Susan E. Ozanne. 2010. « Mechanisms Involved in the Developmental Programming of Adulthood Disease ». *Biochemical Journal* 427 (3): 333-47. <https://doi.org/10.1042/BJ20091861>.
- Waterland, R. A., et R. L. Jirtle. 2003. « Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (15): 5293-5300. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5293-5300.2003>.
- Wei, Yanchang, Cai-Rong Yang, Yan-Ping Wei, Zhao-Jia Ge, Zhen-Ao Zhao, Bing Zhang, Yi Hou, Heide Schatten, et Qing-Yuan Sun. 2015. « Enriched Environment-Induced Maternal Weight Loss Reprograms Metabolic Gene Expression in Mouse Offspring ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (8): 4604-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605642>.
- Weisman, Carol S., Dawn P. Misra, Marianne M. Hillemeier, Danielle Symons Downs, Cynthia H. Chuang, Fabian T. Camacho, et Anne-Marie Dyer. 2011. « Preconception Predictors of Birth Outcomes: Prospective Findings from the Central Pennsylvania Women's Health Study ». *Maternal and Child Health Journal* 15 (7): 829-35. <https://doi.org/10.1007/s10995-009-0473-2>.
- Wells, Ann, William T. Barrington, Stephen Dearth, Amanda May, David W. Threadgill, Shawn R. Campagna, et Brynn H. Voy. 2018. « Tissue Level Diet and Sex-by-Diet Interactions Reveal Unique Metabolite and Clustering Profiles Using Untargeted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry on Adipose, Skeletal Muscle, and Liver Tissue in C57BL6/J Mice ». *Journal of Proteome Research* 17 (3): 1077-90. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00750>.
- Wesolowski, Stephanie R., Karim C. El Kasmi, Karen R. Jonscher, et Jacob E. Friedman. 2017. « Developmental Origins of NAFLD: A Womb with a Clue ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14 (2): 81-96. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.160>.
- Wesolowski, Stephanie R., Christopher M. Mulligan, Rachel C. Janssen, Peter R. Baker, Bryan C. Bergman, Angelo D'Alessandro, Travis Nemkov, et al. 2018. « Switching Obese Mothers to a Healthy Diet Improves Fetal Hypoxemia, Hepatic Metabolites, and Lipotoxicity in Non-Human Primates ». *Molecular Metabolism* 18 (décembre): 25-41. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.09.008>.
- White, Christy L., Megan N. Purpera, et Christopher D. Morrison. 2009. « Maternal Obesity Is Necessary for Programming Effect of High-Fat Diet on Offspring ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296 (5): R1464-72. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.91015.2008>.
- Williams, Lyda, Yoshinori Seki, Patricia M. Vuguin, et Maureen J. Charron. 2014. « Animal Models of in Utero Exposure to a High Fat Diet: A Review ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842 (3): 507-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.006>.
- Willmer, Mikaela, Daniel Berglind, Thorkild I. A. Sørensen, Erik Näslund, Per Tynelius, et Finn Rasmussen. 2013. « Surgically Induced Interpregnancy Weight Loss and Prevalence of Overweight and Obesity in Offspring ». Édité par Aimin Chen. *PLoS ONE* 8 (12): e82247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082247>.
- World Gastroenterology Organisation. 2012. « Stéatose hépatique non alcoolique et stéato-hépatite non alcoolique, WGO global guidelines ».
- Wright, Thomas M., Kevin C.F. Fone, Simon C. Langley-Evans, et Jörg-Peter W. Voigt. 2011. « Exposure to Maternal Consumption of Cafeteria Diet during the Lactation Period Programmes Feeding Behaviour in the Rat ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 29 (8): 785-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.09.007>.
- Xu, C.-R., P. A. Cole, D. J. Meyers, J. Kormish, S. Dent, et K. S. Zaret. 2011. « Chromatin "Prepattern" and Histone Modifiers in a Fate Choice for Liver and Pancreas ». *Science* 332 (6032): 963-66. <https://doi.org/10.1126/science.1202845>.
- Xu, Huiting, Qiang Fu, Yi Zhou, Chengbin Xue, Patrick Olson, Ernest C. Lynch, Ke K. Zhang, et al. 2018. « A Long-Term Maternal Diet Intervention Is Necessary to Avoid the Obesogenic Effect of Maternal High-Fat Diet in the Offspring ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 62 (décembre): 210-20. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.008>.

- Xu, Yang, Shuang Zhang, Shaofeng Lin, Yaping Guo, Wankun Deng, Ying Zhang, et Yu Xue. 2017. « WERAM: A Database of Writers, Erasers and Readers of Histone Acetylation and Methylation in Eukaryotes ». *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1011>.
- Yamagishi, S., et M. Ohta. 1998. « Serum 1,5-Anhydro- d -Glucitol Levels in Liver Cirrhosis ». *Acta Diabetologica* 35 (1): 65-66. <https://doi.org/10.1007/s005920050104>.
- Yamanouchi, Toshikazu, Hiroshi Akanuma, Fumimaro Takaku, et Yasuo Akanuma. 1986. « Marked Depletion of Plasma 1,5-Anhydroglucitol, a Major Polyol, in Streptozocin-Induced Diabetes in Rats and the Effect of Insulin Treatment » 35: 6.
- Yang, Kou-Tai, Chen Lin, Cheng-Wei Liu, et Yi-Chen Chen. 2014. « Effects of Chicken-Liver Hydrolysates on Lipid Metabolism in a High-Fat Diet ». *Food Chemistry* 160 (octobre): 148-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.052>.
- Yazdi, Fereshteh T., Susanne M. Clee, et David Meyre. 2015. « Obesity Genetics in Mouse and Human: Back and Forth, and Back Again ». *PeerJ* 3 (mars): e856. <https://doi.org/10.7717/peerj.856>.
- Yeomans, Martin R., Sirous Mobini, Toby D. Elliman, Helen C. Walker, et Richard J. Stevenson. 2006. « Hedonic and Sensory Characteristics of Odors Conditioned by Pairing with Tastants in Humans. » *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 32 (3): 215-28. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.32.3.215>.
- Youngentob, Steven L., Paul F. Kent, Paul R. Sheehe, Juan C. Molina, Norman E. Spear, et Lisa M. Youngentob. 2007. « Experience-Induced Fetal Plasticity: The Effect of Gestational Ethanol Exposure on the Behavioral and Neurophysiologic Olfactory Response to Ethanol Odor in Early Postnatal and Adult Rats. » *Behavioral Neuroscience* 121 (6): 1293-1305. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.6.1293>.
- Yu, Min, Mingyue Jiang, Chunbo Yang, Yixiang Wu, Yongzhe Liu, Yujie Cui, et Guowei Huang. 2014. « Maternal High-Fat Diet Affects Msi/Notch/Hes Signaling in Neural Stem Cells of Offspring Mice ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (2): 227-31. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.011>.
- Zambrano, E., P. M. Martínez-Samayoa, G. L. Rodríguez-González, et P. W. Nathanielsz. 2010. « RAPID REPORT: Dietary Intervention Prior to Pregnancy Reverses Metabolic Programming in Male Offspring of Obese Rats: Dietary Intervention to Reverse Metabolic Programming Outcomes ». *The Journal of Physiology* 588 (10): 1791-99. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.190033>.
- Zhang, Eric E, Yi Liu, Renaud Dentin, Pagkapol Y Pongsawakul, Andrew C Liu, Tsuyoshi Hirota, Dmitri A Nusinow, et al. 2010. « Cryptochrome Mediates Circadian Regulation of cAMP Signaling and Hepatic Gluconeogenesis ». *Nature Medicine* 16 (10): 1152-56. <https://doi.org/10.1038/nm.2214>.
- Zhang, Song, Janna L. Morrison, Amreet Gill, Leewen Rattanatr, Severence M. MacLaughlin, David Kleemann, Simon K. Walker, et I. Caroline McMillen. 2013. « Maternal Dietary Restriction During the Periconceptional Period in Normal-Weight or Obese Ewes Results in Adrenocortical Hypertrophy, an Up-Regulation of the JAK/STAT and Down-Regulation of the IGF1R Signaling Pathways in the Adrenal of the Postnatal Lamb ». *Endocrinology* 154 (12): 4650-62. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1414>.
- Zhang, Song, Leewen Rattanatr, Janna L. Morrison, Lisa M. Nicholas, Shervi Lie, et I. Caroline McMillen. 2011. « Maternal Obesity and the Early Origins of Childhood Obesity: Weighing Up the Benefits and Costs of Maternal Weight Loss in the Periconceptional Period for the Offspring ». *Experimental Diabetes Research* 2011: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2011/585749>.
- Zhang, Tengfei, Shiwen Wang, Yan Lin, Wei Xu, Dan Ye, Yue Xiong, Shimin Zhao, et Kun-Liang Guan. 2012. « Acetylation Negatively Regulates Glycogen Phosphorylase by Recruiting Protein Phosphatase 1 ». *Cell Metabolism* 15 (1): 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.005>.
- Zhao, Fuqiang, Marie A. Holahan, Xiaohai Wang, Jason M. Uslaner, Andrea K. Houghton, Jeffrey L. Evelhoch, Christopher T. Winkelmann, et Catherine D. G. Hines. 2018. « fMRI Study of the Role of Glutamate NMDA Receptor in the Olfactory Processing in Monkeys ». Édité par Nadine Ravel. *PLOS ONE* 13 (6): e0198395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198395>.
- Zheng, Jia, Xinhua Xiao, Qian Zhang, Miao Yu, Jianping Xu, Zhixin Wang, Cuijuan Qi, et Tong Wang. 2015. « Maternal and Post-Weaning High-Fat, High-Sucrose Diet Modulates Glucose Homeostasis and Hypothalamic POMC Promoter Methylation in Mouse Offspring ». *Metabolic Brain Disease* 30 (5): 1129-37. <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9678-9>.

# **ANNEXES**

# Protocole I. Analyses de données brutes de métabolomique sur W4M

## Préparation des données brutes :

Données brutes au format .raw

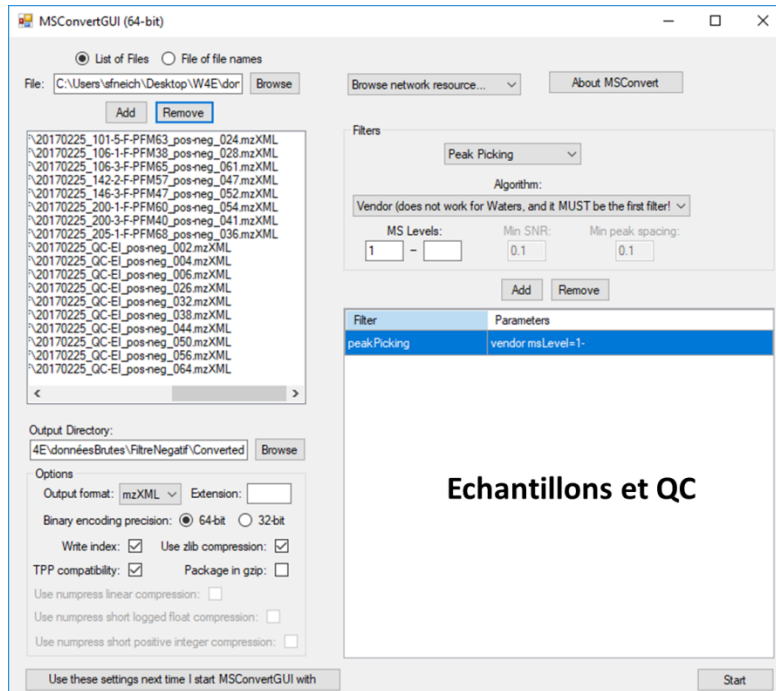
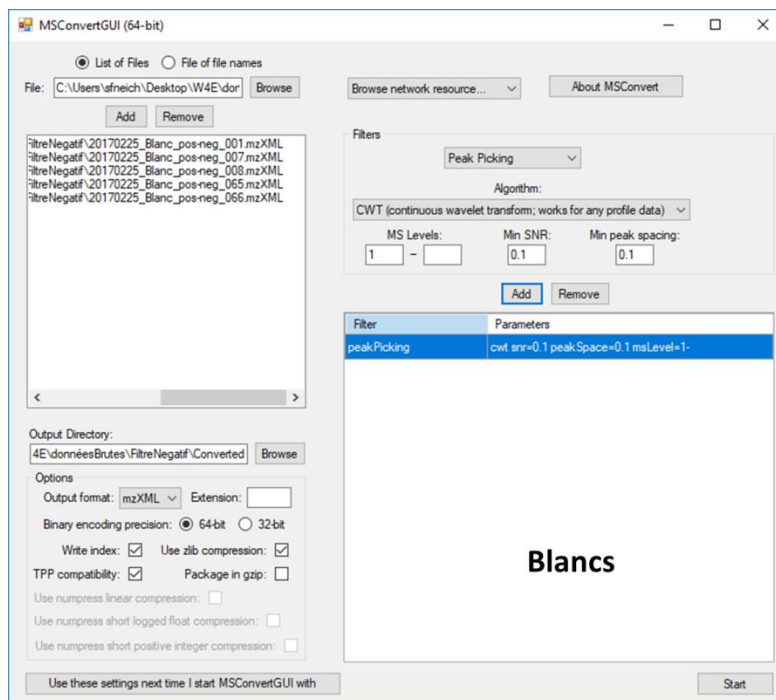
Conversion des fichiers .raw en format .mzXML et centrage des données à l'aide du programme ProteoWizard MSConvertGUI (<http://proteowizard.sourceforge.net/>) :

Ajout des fichiers bruts et choix du dossier de sortie

Format de sortie : mzXML, encodage en 64-bit

Sélectionner Peak Picking, algorithme : CWT pour les Blancs ; Vendor pour échantillons et QC

Appuyer sur le bouton Start



Une fois la conversion terminée il faut filtrer les données si elles ont été acquises en ionisation positive et négative afin d'effectuer le préprocessing séparément. Afin de filtrer, MSConvertGUI doit être utilisé en invite de commande. Eviter les espaces dans le nom de fichier, si besoin remplacer par « \_ ».

Dans mon cas :

#se placer dans le dossier contenant les exécutables ProteoWizard

```
>cd C:\Program Files\ProteoWizard\ProteoWizard 3.0.18229.2cbcfeab4
```

#accès à l'exécutable MSConvert

```
C:\Program Files\ProteoWizard\ProteoWizard 3.0.18229.2cbcfeab4>msconvert
```

#Ecrit à la suite. Dans le dossier contenant les données centroïdées, pour tous les fichiers .mzXML, filtrer sur polarité négative (conserve les données en polarité négative) dossier de sortie = filtreNegatif et extension de fichiers de sortie = .mzXML

```
C:\Users\name\Desktop\W4E\donnéesBrutes\MSConvertFirst\*.mzXML --filter "polarity negative" -o
```

```
C:\Users\name\Desktop\W4E\donnéesBrutes\MSConvertFirst\filtreNegatif --mzXML
```

Fichier de sorties : D:\Documents\Sofiane\Thèse Sofiane\Metabolomique\W4E\ commandesFiltreNeg.docx

Ensuite il faut créer un fichier des métadatas des échantillons (sampleMetadata)

Ce fichier peut être créé simplement sur Excel, la première colonne contient le nom/l'identifiant des fichiers préalablement convertis.

Il doit contenir obligatoirement les colonnes : sampleType , injectionOrder et batch (dans le cas où une correction sur le batch doit être faite)

**sampleType** : contient les valeurs **sample**, **pool**, et **blank** (possibilité d'utiliser pool+n° dans le cas de pools dilués ex : dilué 4 fois → pool4)

**injectionOrder** : contient les numéros indiquant l'ordre d'injection lors de l'analyse LC-MS

**batch** : contient l'identifiant de batch de chaque échantillon (mettre une lettre en première ex : B1, B2,...)

Les colonnes suivantes peuvent être remplies avec les différents facteurs d'intérêt pour les analyses statistiques.

Il est fortement recommandé de n'utiliser que des lettres, des chiffres et le caractère « \_ » pour tous les noms utilisés dans le tableau, W4M utilisant R il peut y avoir des problèmes de format.

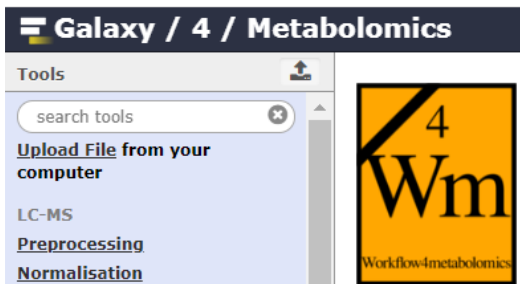
Exemple :

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	sampleMetadata	sampleType	injectionOrder	mode	batch	age	bmi	gender
2	HU_neg_017	sample		17 neg	ne1	41	23.03	M
3	HU_neg_028	sample		23 neg	ne1	41	23.92	F
4	HU_neg_034	sample		26 neg	ne1	52	23.37	M
5	HU_neg_051	sample		45 neg	ne1	24	23.23	F

Sauver ensuite le fichier au format tabulaire (separator : tabulation) en .tsv (l'extension .txt fonctionne aussi)



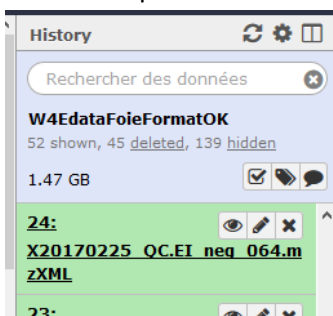
## Import des données sur W4M :



Cliquer sur « Upload file »

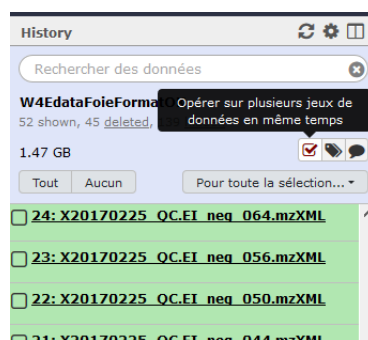
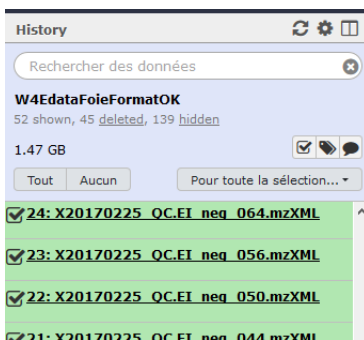
Dans la fenêtre qui s'ouvre, glisser-déposer les fichiers à uploader ou bien cliquer sur « Choose local file » et sélectionner les fichiers à uploader (fichiers mzXML et tsv)

Une fois l'upload effectué les fichiers se retrouvent dans la partie droite de la fenêtre W4M

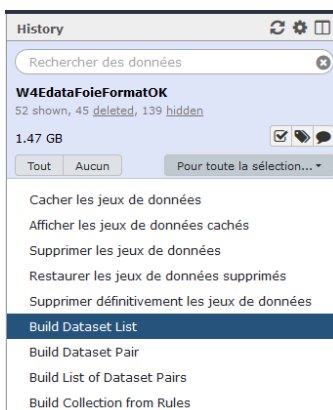


Pour la suite, un fichier collection contenant les fichiers bruts est créé :

Cliquer sur la case cochée et sélectionner les fichiers mzXML précédemment importés.

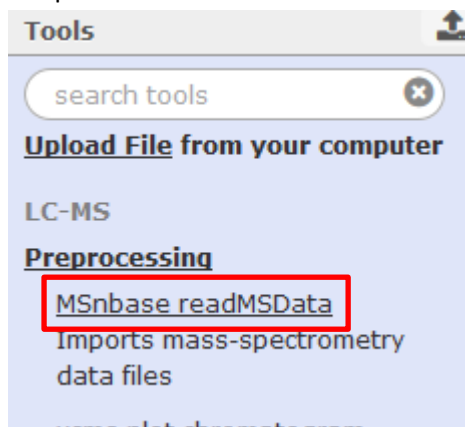


Cliquer sur « Pour toute la sélection » et « Build Dataset List »



## Préprocessing :

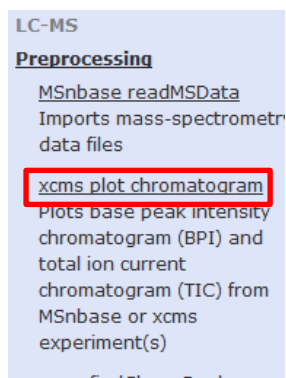
- Import et conversion de la collection en fichiers MSnExp : **MSnbase\_readMSData**



Cliquer sur le bouton « Dataset collection » à gauche de la barre de sélection de fichiers et sélectionner la collection de fichiers mzXML à traiter, puis cliquer sur le bouton « Execute ».

Le set de fichiers de sortie est au format raw.RData

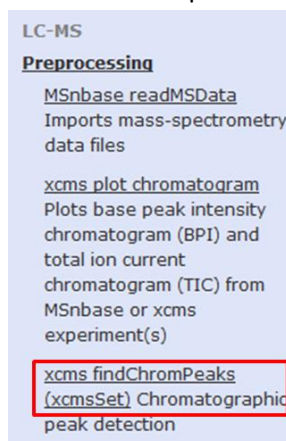
- Contrôle visuel des données et prévision du bandwidth : **xcms\_plot\_chromatogram**



Sélectionner le set de fichiers raw.RData précédemment généré ainsi que le fichier sampleMetadata et appuyer sur le bouton « Execute ».

Les fichiers de sortie TICs et BPIs , permettent de voir l'intensité détectée pour chaque échantillon en fonction du temps de rétention.

-Détection des pics : **xcms findChromPeaks**



Sélectionner le set de fichiers raw.RData précédemment généré (et si présent la liste des ROI (Regions Of Interest) permettant de réduire les phases de calcul).

Pour « Extraction method for peak detection », sélectionner « **CentWave – chromatographic peak detection** »

## using the centWave method.”

Paramètres à modifier dans le cas d’analyses en Haute Résolution :

Max tolerated ppm m/z deviation in consecutive scans in ppm : **10**

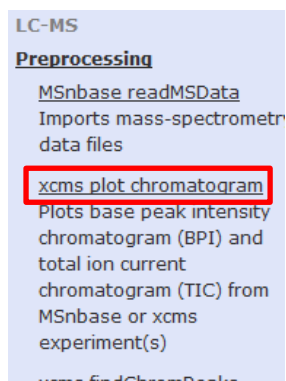
Min,Max peak width in seconds : **20,60**

Prefilter step for for the first analysis step (ROI detection) : **3,10000**

Minimum difference in m/z for peaks with overlapping retention times : **0.01** voir **0.001**

Les fichiers de sortie sont dans le set de données au format raw.xset.RData et raw.xset.log.txt

- Contrôle visuel des données : **xcms\_plot\_chromatogram**

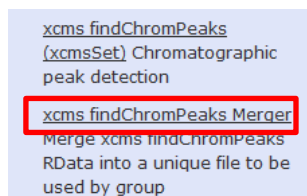


Sélectionner le set de fichiers raw.xset.RData précédemment généré et le fichier sampleMetadata et appuyer sur le bouton « Execute ».

Les fichiers de sortie TICs et BPIs , permettent de voir l’intensité détectée pour chaque échantillon en fonction du temps de rétention.

- Une fois les vérifications faites, le set de données doit être assemblé pour la suite des analyses.

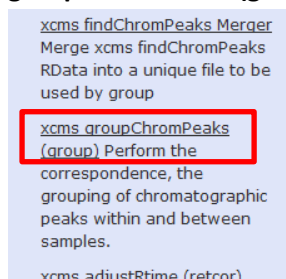
Utiliser l’outil **xcms findChromPeaks Merger** :



Sélectionner le set de fichiers raw.xset.RData généré précédemment ainsi que le fichier sampleMetadata utilisé jusqu’à présent puis appuyer sur le bouton « Execute ».

Le fichier de sortie se nomme par défaut xset.merged.RData et peut être renommé, il est au format rdata.xcms.findchrompeaks .

- Afin d’analyser convenablement les différents échantillons, les peaks identiques doivent être groupés entre eux afin de discerner les différences entre échantillons/blancs. Pour cela nous utilisons l’outil **xcms groupChromPeaks (group)** :



Sélectionner le fichier xset.merged.RData précédemment généré et pour la

« Method to use for grouping » sélectionner « **PeakDensity – peak grouping based on time dimension peak densities.** »

Paramètres à modifier dans le cas d'analyses en Haute Résolution :

Bandwidth : 5.0

Minimum fraction of sample : 0.3

Width of overlapping m/z slices : 0.01 voir -0.01

Get the Peak List : sélectionner Yes

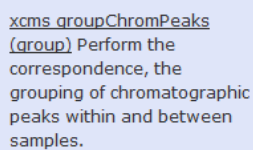
Number of decimal places for mass values reported in ions' identifiers : 6

Possibilité de remplacer les valeurs NA par 0 dans la matrice de données (dataMatrix), peut être nécessaire pour certaines phases d'analyses et de statistiques en aval.

Les autres paramètres peuvent garder leur valeur par défaut.

Cet outil génère des fichiers dataMatrix et variableMetadata permettant les analyses en aval.

- Une fois les peaks associés entre il faut corriger la dérive du temps de rétention entre les runs. Nous utilisons l'outil **xcms adjustRtime (retcor)** :



[xcms.groupChromPeaks](#)  
(group) Perform the correspondence, the grouping of chromatographic peaks within and between samples.

[xcms.adjustRtime \(retcor\)](#)  
Retention Time Correction

[xcms.fillChromPeaks](#)

Sélectionner le set de fichiers xset.merged.groupChromPeaks.RData

précédemment généré.

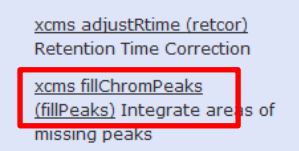
Pour "Method to use for retention time correction" sélectionner "**PeakGroups – retention time correction based on alignment of features (peak groups) present in most/all samples.**"

Pour "Minimum required fraction of samples in which peaks for the peak group were identified" la valeur optimale est obtenue par le calcul : (nombre d'échantillons – nombre de blancs) / nombre d'échantillons. Le reste des paramètres peut garder les valeurs par défaut. Dans le fichier pdf qui est généré en sortie, la densité des peaks est normalisée sur la valeur du plus grand peak observé.

- Une nouvelle phase de groupement des peaks est ensuite nécessaire après ajustement, utiliser l'outil **xcms groupChromPeaks (group)** en sélectionnant le fichier xset.merged.groupChromPeaks.adjustRtime.RData avec les mêmes paramètres que précédemment.

Il peut être bien, voir nécessaire d'augmenter le **minimum number of samples** afin d'avoir un biais inter échantillon moins important, et aussi éviter la sélection de « faux » peaks.

- Une phase d'intégration des peaks manquants est ensuite faite à l'aide de l'outil **xcms fillChromPeaks (fillPeaks)** :



[xcms.adjustRtime \(retcor\)](#)  
Retention Time Correction

[xcms.fillChromPeaks](#)  
(fillPeaks) Integrate areas of missing peaks

Sélectionner le fichier

xset.merged.groupChromPeaks.adjustRtime.groupChromPeaks.RData généré précédemment et modifier la valeur de « **Number of decimal places for mass values reported in ions' identifiers** » en la paramétrant à 6. Possibilité de remplacer les valeurs NA par 0 dans la matrice de données (dataMatrix), peut être nécessaire pour certaines phases d'analyses et de statistiques en aval.

- Enfin pour terminer l'étape de pré processing nous utilisons l'outil **CAMERA.annotate** :

[xcms fillChromPeaks \(fillPeaks\)](#) Integrate areas of missing peaks

[xcms process history](#) Create a summary of XCMS analysis

[proFIA](#) Preprocessing of FIA-HRMS data

**CAMERA.annotate** CAMERA annotate function. Returns annotation results (isotope peaks, adducts and

Sélectionner le fichier

xset.merged.groupChromPeaks.adjustRtime.groupChromPeaks.fillChromPeaks.RData

Pas modifié les paramètres pendant la formation car le set de données n'était pas complet.

Le workflow est accessible en suivant ce lien :

<https://galaxy.workflow4metabolomics.org/u/ssafistibler/w/copy-of-workflowpreprocesslc-hrms>

## Protocole II. Analyses W4M des données de métabolomiques annotées par Profilomic

- Constitution des tables pour W4M → Afin de procéder aux analyses sur W4M, les fichiers excel fournis par Profilomic doivent être retravaillés. Ces analyses utilisent pour chaque tissu, 3 tableaux au format tabulé :

\* Un tableau « Sample metadata » contenant les informations relatives aux individus analysés (identifiant, groupe maternel, régime post-sevrage) ;

	A	B	C	D	E
1	individualNumber	dietMat	dietSelf	sex	dietGroup
2	X96_6_CMHFD	CM	HFD	M	CMHFD
3	X94_5_CMCD	CM	CD	M	CMCD
4	X94_4_CMHFD	CM	HFD	M	CMHFD
5	X93_6_CMHFD	CM	HFD	M	CMHFD
6	X93_4_CMCD	CM	CD	M	CMCD

\* Un tableau « Variables metadata » contenant les informations relatives aux métabolites de notre jeu de données (nom du métabolite, identifiants, mode d'ionisation positif ou négatif) ;

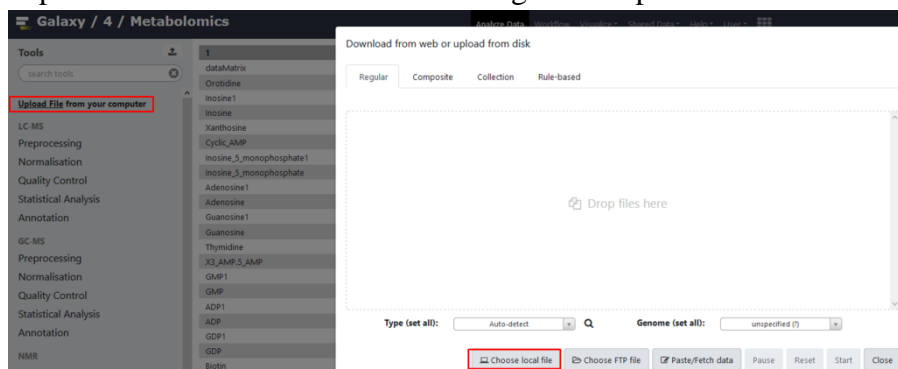
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	individualNumber	NVAR	CEA	Adduct	Formula	m.z	Retention.time.sec	CAS	Num.HMDB	Classe	Sous.Classe	chebi_id	Metabolic.Pathway.Name	
2	Aminobutyric_acid1	N85		974 M_H	C4H9NO2	102.056		737 1492_24_6	HMDB00452	Amino.Acids	Amino.Acids	35619	NA	
3	N_Acetylneuraminic_acid1	N127		801 M_H	C11H19NO9	308.0987		835 131_48_6	HMDB00230	Carbohydrat	Sugar.Acids.	45744	Amino.Sugar.Metabolism	
4	N_Acetylneuraminic_acid2	P73		801 M+H	C11H19NO9	310.1133		834 131_48_6	HMDB00230	Carbohydrat	Sugar.Acids.	45744	Amino.Sugar.Metabolism	
5	Butyryl_carnitine	P170		1134 M+H	C11H21NO4	232.1543		441 25576_40_3	HMDB02013	Lipids	Fatty.Acids.Es	7676	Oxidation.of.Branched.Chain.F	
6	Perillic_acid	N24		354 M_H	C10H14O2	165.0921		106 7694_45_3	HMDB04586	Lipids	Prenol.Lipid	36999	NA	
7	X3_Hydroxybutyric_acid1	N348		356 M_H	C4H8O3	103.0401		523 6168_83_8	HMDB00442	Organic.Acids	Hydroxy.Acids	17290	Valine,.Leucine.and.Isoleucine	
8	X3_Hydroxybutyric_acid2	N355		356 M_H	C4H8O3	103.0401		523 6168_83_8	HMDB00442	Organic.Acids	Hydroxy.Acids	17290	Valine,.Leucine.and.Isoleucine	

\* Un tableau « Data matrix » contenant le nom des métabolites (en ordonnée) et l'intensité détectée chez chaque individu analysé (en abscisse).

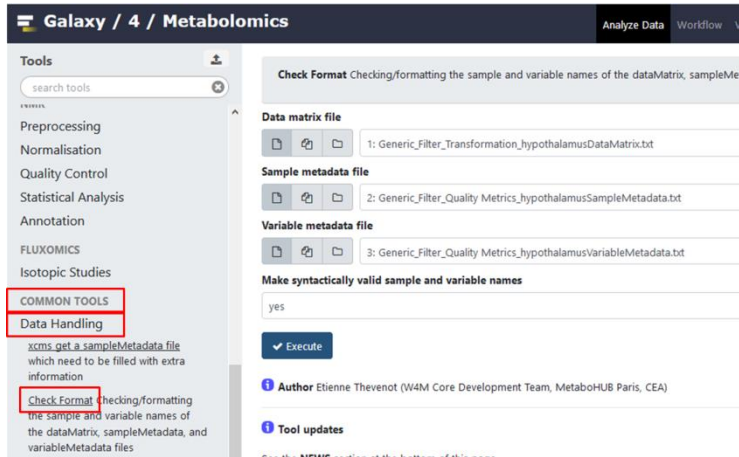
	A	B	C	D	E	F	G
individualNumber		X96_6_CMHF	X94_5_CMCC	X94_4_CMHF	X93_6_CMHF	X93_4_CMCC	X88_2_
Aminobutyric_acid1		22200000	11400000	13000000	12700000	14300000	91
N_Acetylneuraminic_acid1		42200000	36800000	33700000	44300000	39700000	312
N_Acetylneuraminic_acid2		66200000	60500000	52200000	64000000	70900000	43
Butyryl_carnitine		13100000	20100000	26400000	13600000	19800000	167
Perillic_acid		98000000	44800000	100000000	130000000	74300000	66
X3_Hydroxybutyric_acid1		289000000	959000000	1500000000	942000000	1590000000	1980

- Import des données sur W4M :

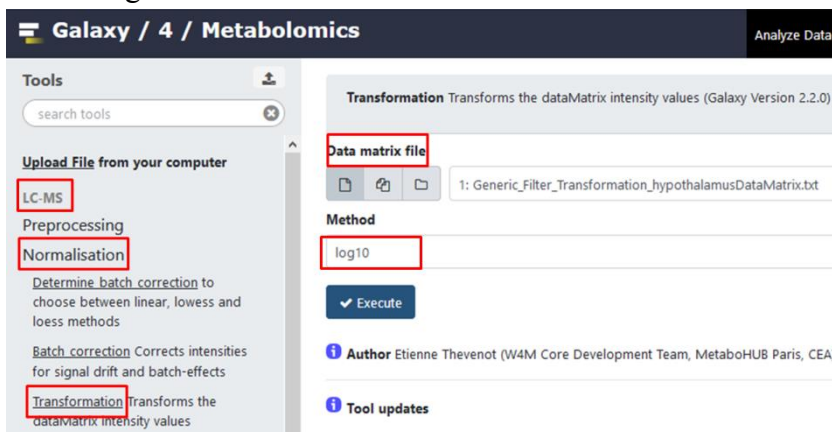
L'import des données peut être fait à partir de fichiers présents sur l'ordinateur après avoir cliqué sur « Upload File ». Dans la fenêtre il est possible de choisir manuellement les fichiers à importer depuis son ordinateur ou sur un ordinateur distant. Il est aussi possible de copier/coller les fichiers ou bien de les glisser-déposer.



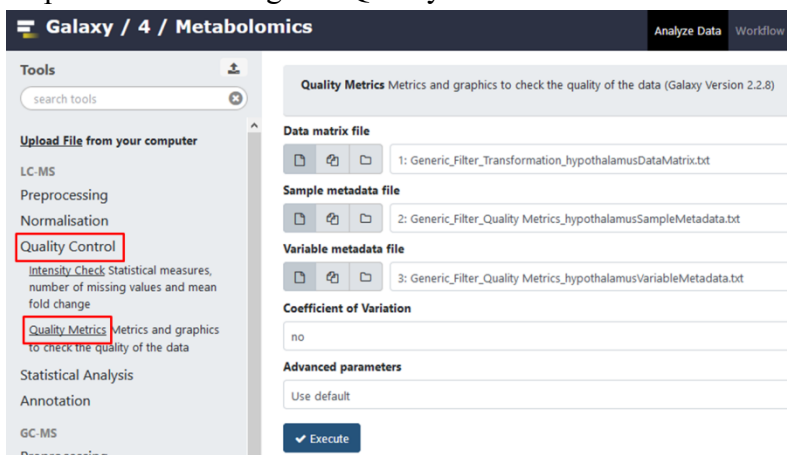
- Une fois les données importées, utiliser l'outil « Check Format » présent dans l'onglet « Data Handling » de la section « COMMON TOOLS ». Cet outil a pour but de vérifier que les données sont organisées comme il convient dans les trois tables, en accord avec l'utilisation de R concernant les caractères spéciaux. Si ce n'est pas le cas, W4M propose d'effectuer les modifications nécessaires à l'utilisation des fichiers.



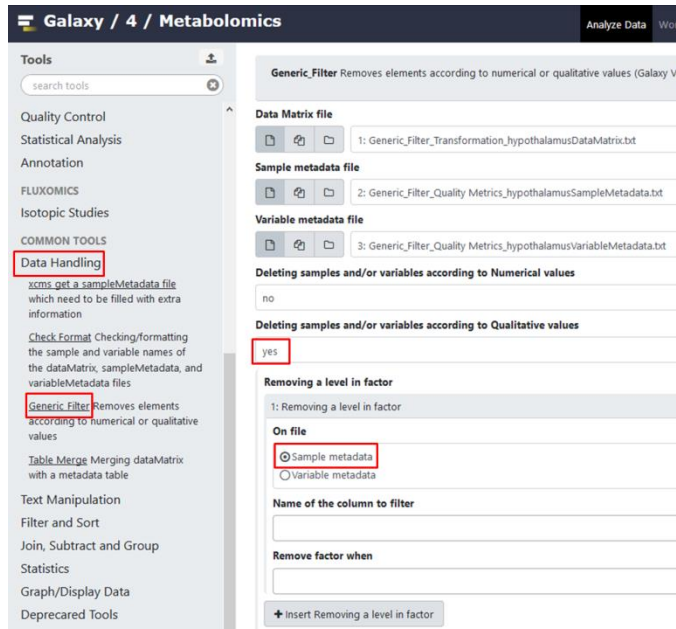
- Afin d'utiliser les intensités mesurées pour les métabolites, il est recommandé de procéder à une transformation en log10 de la matrice de données, via l'outil « Transformation » présent dans l'onglet « Normalisation » de la section « LC-MS ».



- Procéder ensuite à l'évaluation de la qualité des données grâce à l'outil « Quality metrics », disponible dans l'onglet « Quality Control » de la section « LC-MS ».



- Si un individu est outlier (présentant trop de données aberrantes) il est possible de le supprimer en utilisant l'outil « Generic Filter », disponible dans l'onglet « Data Handling » de la section « COMMON TOOLS ». Sélectionner « yes » dans « Deleting samples and/or variables according to Qualitative values », sur le fichier « Sample metadata », choisir le nom de la colonne à filtrer et entrer l'identifiant de l'individu à supprimer du jeu de données.



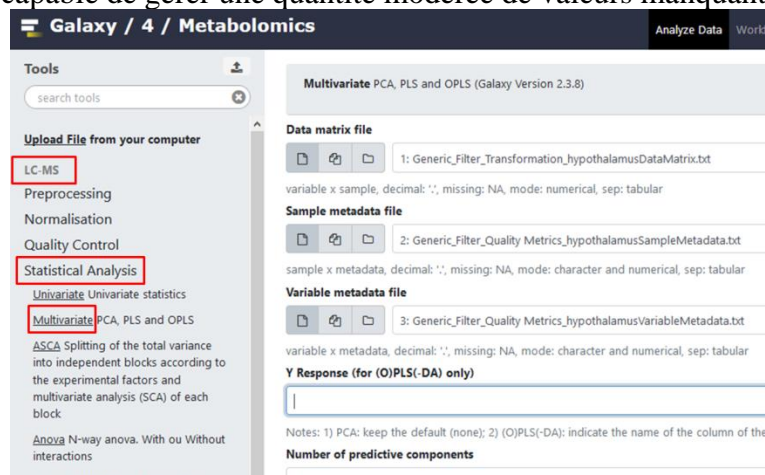
- Analyses statistiques multivariées / descriptives → « Multivariate » dans l'onglet « Statistical analysis » de la section « LC-MS », avec comme paramètre :

- « Y Response » : groupe maternel ou régime post-sevrage ;
- « Number of predictive component » : NA, pour avoir une suggestion sur le nombre optimal de composantes prédictives ;
- « Number of orthogonal components » : 0 ;
- « Samples to be tested » : no ;

Dans « Advanced graphical parameters » → Dépend de ce que l'on veut voir apparaître sur les figures en sortie de PLS-DA ;

Dans « Advanced computational parameters » →

- « Scaling » : standard ;
- « Number of permutation » : 1000 ;
- « Log10 transformation » : no ;
- « Algorithm » : nipals (non-linear iterative partial least squares), un algorithme capable de gérer une quantité modérée de valeurs manquantes) ;





Nous avons décidé de réaliser les analyses univariées en séparant les métabolites acquis en ionisation positive des métabolites acquis en ionisation négative. Pour cela il faut utiliser la fonction « Generic filter » : sur les fichiers **Variable metadata** en sortie de PLS-DA pour séparer les données positives et négatives, une première fois pour supprimer les données acquises en ionisation positive (M\_H), puis filtrer de nouveau les fichiers en sortie de PLS-DA pour supprimer les données acquises en ionisation négative (M-H). Penser à renommer les fichiers en sortie.

- Analyses statistiques univariées / différentielles → « Anova » dans l'onglet « Statistical Analysis » de la section « LC-MS », avec comme paramètres :

« Mode » : column ;

« Condition » : régime post-sevrage ;

« Conditions for N-ways anova » : groupe maternel ;

« Enable interaction response p-values » : Yes ;

« Threshold » : 0.05 ;

« Selection method » : union / weak ;

« Separator of column » : tabulation ;

« Decimal separator » : "." ;

The screenshot shows the 'Statistical Analysis' section of a software interface. The left sidebar lists various tools, with 'Statistical Analysis' selected. The main panel displays the configuration for an ANOVA test. The 'Data Matrix file' is 'M-H\_Generic\_Filter\_Generic\_Filter\_Transformation\_hypothalamusDataMatrix.txt'. The 'Sample Metadata file' is 'M-H\_Generic\_Filter\_Generic\_Filter\_Quality Metrics\_hypothalamusSampleMetadata.txt'. The 'Variable Metadata file' is 'M-H\_Generic\_Filter\_Generic\_Filter\_Quality Metrics\_hypothalamusVariableMetadata.txt'. The 'Mode' is set to 'column'. The 'Condition' is 'dietSelf'. The 'Conditions for N-ways anova' section shows '1: Conditions for N-ways anova' with 'Condition' set to 'dietMat'. The 'Enable interaction response p-values' is set to 'Yes'. The 'PValue adjusted method' is 'fdr'. The 'Threshold' is '0.05'. The 'Selection method' is 'union / weak'. The 'Separator of columns' is 'tabulation'. The 'Decimal separator' is '.'. An 'Execute' button is at the bottom.

Tableau I. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles réalisées dans le foie

Métabolite	Identifiant CEA	Mode d'acquisition	Formule brute	Masse (m/z)	Temps de rétention (minutes)	Identifiant CAS	IdentifiantHMDB	Identifiant ChEBI	FDR Régime post-sevrage	FDR Groupe maternel	pval.FDR Interaction
X1-5-Anhydro-D-sorbitol	357	Négatif	C6H12O5	163/0612	611	154-58-5	HMDB02712	16070	1.00E-10	6.94E-01	3.83E-01
Betaine1	439	Négatif	C5H11NO2	116/0717	578	107-43-7	HMDB00043	17750	7.36E-07	6.94E-01	9.83E-01
X2-Deoxyribose-5-phosphate	832	Négatif	C5H11O7P	213/017	904	102916-66-5	HMDB01031	16132	2.67E-06	7.14E-01	5.53E-01
Betaine	439	Positif	C5H11NO2	118/0863	580	107-43-7	HMDB00043	17750	7.35E-06	8.20E-01	8.56E-01
N-N-Dimethylglycine	727	Positif	C4H9NO2	104/0706	638	1118-68-9	HMDB00092	17724	7.35E-06	8.80E-01	5.85E-01
D-Fructose-1-phosphate / D-Fructose-6-phosphate / D-Mannose-6-phosphate/Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Glucose-6-PO4 / Mannose-1-phosphate1	477 / 700 / 490 / 1186 / 281 / 65 / 416	Négatif	C6H13O9P	259/0224	964	15978-08-2, 643-13-0, 0.3672-15-9, 9.2255-14-3, 59-56-3, 56-73-5, 27251-84-9	HMDB01076 / HMDB00124 / HMDB01078 / HMDB00645 / HMDB01586 / HMDB01401 / HMDB06330	704854 / 15946 / 49728 / 17973 / 16077 / 4170 / 35374	8.73E-06	6.32E-01	2.79E-01
N-N-Dimethylglycine1	727	Négatif	C4H9NO2	102/056	648	1118-68-9	HMDB00092	17724	8.73E-06	8.35E-01	6.19E-01
NAD	59	Positif	C21H27N7O14P2	664/1164	885	53-84-9	HMDB00902	15846	9.29E-06	8.20E-01	8.31E-01
Guanine1	1102	Positif	C5H5N5O	152/0567	625	73-40-5	HMDB00132	16235	9.29E-06	8.20E-01	8.76E-01
D-Fructose-1-phosphate / D-Fructose-6-phosphate / D-Mannose-6-phosphate/Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Glucose-6-PO4 / Mannose-1-phosphate	477 / 700 / 490 / 1186 / 281 / 65 / 416	Négatif	C6H13O9P	259/0224	999	15978-08-2, 643-13-0, 0.3672-15-9, 9.2255-14-3, 59-56-3, 56-73-5, 27251-84-9	HMDB01076 / HMDB00124 / HMDB01078 / HMDB00645 / HMDB01586 / HMDB01401 / HMDB06330	704854 / 15946 / 49728 / 17973 / 16077 / 4170 / 35374	9.85E-06	6.34E-01	3.21E-01
UMP	172	Positif	C9H13N2O9P	325/0432	956	58-97-9	HMDB00288	16695	1.01E-05	8.20E-01	5.85E-01
UMP2	172	Négatif	C9H13N2O9P	323/0286	957	58-97-9	HMDB00288	16695	1.06E-05	7.52E-01	6.19E-01
Imidazolelactic-acid	283	Positif	C6H8N2O3	157/0608	667	876-19-7	HMDB02320	27487	4.35E-05	8.20E-01	8.70E-01
Argininosuccinic-acid	687	Positif	C10H18N4O6	291/1299	986	2387-71-5	HMDB00052	15682	4.35E-05	9.79E-01	9.21E-01
Capryloylglycine	1199	Négatif	C10H19NO3	200/1292	114	14246-53-8	HMDB00832	74099	7.42E-05	6.94E-01	5.88E-01
Imidazolelactic-acid1	283	Négatif	C6H8N2O3	155/0462	665	876-19-7	HMDB02320	27487	7.42E-05	6.94E-01	8.20E-01
Stachydrine	1110	Positif	C7H13NO2	144/1019	537	471-87-4	HMDB04827	35280	1.45E-04	8.20E-01	9.82E-01
N-Glycylneuraminic-acid	580	Négatif	C11H19NO10	324/0936	890	1113-83-3	HMDB00833	62084	1.50E-04	8.58E-01	9.67E-01
Cyclic-ADP-ribose	1001	Négatif	C15H21N5O13P2	540/0538	883	119340-53-3	NA	NA	1.60E-04	6.94E-01	6.19E-01
X3-AMP / 5-AMP1	176 / 972	Négatif	C10H14N5O7P	346/0558	872	84-21-9, 61-19-8	HMDB03540 / HMDB00045	28931 / 16027	1.60E-04	8.12E-01	6.03E-01
Taurine1	32	Négatif	C2H7NO3S	124/0074	841	107-35-7	HMDB00251	15891	1.60E-04	8.45E-01	7.12E-01
X2-O-Methylinosine	1115	Négatif	C11H14N4O5	281/0891	352	NA	NA	NA	2.29E-04	8.26E-01	6.03E-01
Fumaric-acid / Maleic-acid	12 / 556	Négatif	C4H4O4	115/0037	964	110-17-8, 110-16-7	HMDB00134 / HMDB00176	18012 / 183	2.78E-04	8.45E-01	8.30E-01
NAD1	59	Négatif	C21H27N7O14P2	662/1018	883	53-84-9	HMDB00902	15846	2.90E-04	6.94E-01	6.19E-01
D-Glucosamine-6-phosphate2	701	Négatif	C6H14NO8P	258/0384	970	3616-42-0	HMDB01254	15873	2.91E-04	6.94E-01	3.94E-01
Dihydroxyacetone-phosphate1	279	Négatif	C3H7O6P	168/9907	945	57-04-5	HMDB01473	16108	3.04E-04	6.94E-01	6.03E-01
GMP2	185	Négatif	C10H14N5O8P	362/0507	1009	85-32-5	HMDB01397	17345	3.86E-04	7.52E-01	6.19E-01
Diglycolic-acid / Malic-acid	1213 / 15	Négatif	C4H6O5	133/0142	964	NA, 6915-15-7	NA / HMDB00744	NA / 6650	3.86E-04	8.45E-01	8.66E-01
L-Glutamic-acid4	222	Positif	C5H9NO4	148/0605	884	56-86-0	HMDB00148	16015	3.96E-04	9.79E-01	5.85E-01
N-Methyl-D-aspartic-acid	270	Positif	C5H9NO4	148/0605	884	6384-92-5	HMDB02393	31882	3.96E-04	9.79E-01	5.85E-01
Quinolinic-acid	81	Négatif	C7H5NO4	166/0146	926	89-00-9	HMDB00232	16675	4.18E-04	9.89E-01	8.66E-01
X13-5-Hydroxyoctadeca-9Z-11E-dienoic-acid	360	Négatif	C18H32O3	295/2279	91	NA	NA	NA	5.14E-04	7.52E-01	8.66E-01
L-Cysteinesulfonic-acid	547	Négatif	C3H7NO4S	152/0023	529	1115-65-7	HMDB00996	41721	5.14E-04	8.98E-01	8.30E-01
X5-Aminoolevulinic-acid / cis-4-hydroxy-D-proline / trans-3-Hydroxy-L-proline / trans-4-hydroxy-L-proline2	679 / 96 / 912 / 889	Négatif	C5H9NO3	130/051	859	106-60-5, 2584-71-6, NA, 51-35-4	HMDB01149 / HMDB06046 / HMDB59659 / HMDB00725	17549 / 16231 / 16889 / 18095	5.65E-04	8.86E-01	8.64E-01
X1-Methylhistidine / 3-Methylhistidine / Methyl-DL-histidine1	41 / 1013 / 1072	Négatif	C7H11N3O2	168/0778	737	332-80-9, 368-16-1, NA	HMDB00001 / HMDB00479 / NA	50599 / 27596 / NA	6.44E-04	6.94E-01	8.30E-01
GMP	185	Positif	C10H14N5O8P	364/0653	1010	85-32-5	HMDB01397	17345	6.63E-04	8.20E-01	5.85E-01
Taurine2	32	Positif	C2H7NO3S	126/0219	842	107-35-7	HMDB00251	15891	6.63E-04	9.79E-01	6.84E-01
S-Adenosyl-homocysteine1	126	Négatif	C14H20N6O5S	383/1143	757	979-92-0	HMDB00939	16680	8.10E-04	8.98E-01	7.65E-01
X3-AMP / 5-AMP2	176 / 972	Positif	C10H14N5O7P	348/0704	871	84-21-9, 61-19-8	HMDB03540 / HMDB00045	28931 / 16027	8.21E-04	8.80E-01	5.42E-01
S-Adenosyl-homocysteine	126	Positif	C14H20N6O5S	385/1289	758	979-92-0	HMDB00939	16680	8.21E-04	9.79E-01	5.85E-01
Indoxyl-sulfate	1149	Négatif	C8H7NO4S	212/0023	194	487-94-5	HMDB00682	43355	8.38E-04	8.45E-01	8.20E-01
X3-Methylcrotonyl-glycine / N-Tiglylglycine2	1137 / 1136	Positif	C7H11NO3	158/0812	219	33008-07-0, 35842-45-6	HMDB00459 / HMDB00959	68499 / 73018	8.53E-04	8.20E-01	5.85E-01
D-Glucosamine-6-phosphate	701	Positif	C6H14NO8P	260/053	970	3616-42-0	HMDB01254	15873	8.53E-04	9.79E-01	4.31E-01
Nervonic-acid	732	Négatif	C24H46O2	365/3425	78	506-37-6	HMDB02368	44247	9.44E-04	8.98E-01	3.94E-01
Methylhippurate	1055	Négatif	C10H11NO3	192/0666	127	1205-08-9	HMDB00859	70869	1.02E-03	8.45E-01	9.31E-01
N-Isobutyrylglycine	1125	Négatif	C6H11NO3	144/0666	330	15926-18-8	HMDB00730	70979	1.33E-03	8.45E-01	4.44E-01
ortho-Methylhippuric-acid / meta-Methylhippuric-acid / para-Methylhippuric-acid / Phenylacetylglycine	990 / 1033 / 1005 / 1054	Négatif	C10H11NO3	192/0666	212	42013-20-7, 7.1205-08-9, 9.27115-50-0, 500-98-1	HMDB11723 / HMDB00859 / HMDB13292 / HMDB00821	68455 / 70869 / 68552 / 27480	1.33E-03	7.73E-01	9.86E-01
X1-Methylhistidine / 3-Methylhistidine / Methyl-DL-histidine2	41 / 1013 / 1072	Positif	C7H11N3O2	170/0924	731	332-80-9, 368-16-1, NA	HMDB00001 / HMDB00479 / NA	50599 / 27596 / NA	1.43E-03	8.20E-01	6.29E-01
X2-Aminopyridine-3-carboxylic-acid	1077	Négatif	C6H6N2O2	137/0357	413	5345-47-1	HMDB61680	68572	1.45E-03	8.98E-01	6.19E-01
gamma-Linolenic-acid	707	Négatif	C18H30O2	277/2173	86	506-26-3	HMDB03073	28661	1.50E-03	6.97E-01	1.42E-01
Inosine-5-monophosphate1	530	Négatif	C10H13N4O8P	347/0398	991	131-99-7	HMDB00175	17202	1.63E-03	6.94E-01	6.19E-01
Serine1	37	Négatif	C3H7NO3	104/0353	850	56-45-1	HMDB00187	17115	1.73E-03	8.45E-01	8.99E-01
ADP2	178	Négatif	C10H15N5O10P2	426/0221	1012	58-64-0	HMDB01341	16761	1.82E-03	8.98E-01	9.33E-01
Sebacic-acid	13	Négatif	C10H18O4	201/1132	688	111-20-6	HMDB00792	41865	1.82E-03	6.94E-01	5.97E-01
X2-O-Methylguanosine1	1120	Négatif	C11H15N5O5	296/1	475	2140-77-4	HMDB05862	19702	2.03E-03	8.45E-01	8.30E-01
Perillic-acid	354	Négatif	C10H14O2	165/0921	106	7694-45-3	HMDB04586	36999	2.09E-03	6.94E-01	6.03E-01
Xanthosine1	275	Négatif	C10H12N4O6	283/0684	727	146-80-5	HMDB00299	18107	2.26E-03	9.70E-01	6.03E-01
L-Saccharopine2	810	Positif	C11H20N2O6	277/1394	962	997-68-2	HMDB00279	16927	2.33E-03	9.79E-01	6.43E-01
X1-Methyladenosine	237	Positif	C11H15N5O4	282/1197	499	15763-06-1	HMDB03331	16020	2.60E-03	9.79E-01	9.82E-01
X5-Aminoolevulinic-acid / cis-4-hydroxy-D-proline / trans-3-Hydroxy-L-proline / trans-4-hydroxy-L-proline1	679 / 96 / 912 / 889	Négatif	C5H9NO3	130/051	825	106-60-5, 2584-71-6, NA, 51-35-4	HMDB01149 / HMDB06046 / HMDB59659 / HMDB00725	17549 / 16231 / 16889 / 18095	2.73E-03	6.94E-01	4.86E-01
Phosphonoacetic-acid	601	Négatif	C2H5O5P	138/9802	949	4408-78-0	HMDB04110	15732	2.73E-03	7.14E-01	5.07E-01
UDP1	171	Négatif	C9H14N2O12P2	402/9949	1018	58-98-0	HMDB00295	17659	2.78E-03	8.45E-01	6.92E-01
Hydroxyphenylpyruvic-acid	218	Négatif	C9H8O4	179/035	340	156-39-8	HMDB00707	15999	2.84E-03	8.45E-01	5.88E-01
Pyrrrole-2-carboxylic-acid	329	Négatif	C5H5NO2	110/0247	461	634-97-9	HMDB04230	36751	2.84E-03	8.75E-01	6.19E-01
Uridine	998	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	463	58-96-8	HMDB00296	16704	2.84E-03	8.76E-01	6.20E-01
Inosine-5-monophosphate	530	Positif	C10H13N4O8P	349/0544	991	131-99-7	HMDB00175	17202	2.87E-03	8.20E-01	5.85E-01
Phosphoenolpyruvic-acid	254	Négatif	C3H5O6P	166/9751	1031	138-08-9	HMDB00263	44897	3.00E-03	6.94E-01	8.13E-01

Muramic-acid1	565	Négatif	C9H17NO7	250/0932	825	1114-41-6	HMDB03254	28118	3.36E-03	6.94E-01	5.07E-01
L-Alanyl-L-proline	946	Négatif	C8H14N2O3	185/0932	503	NA	HMDB28695	NA	3.36E-03	6.94E-01	6.28E-01
X4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol-sulfate	786	Négatif	C9H12O7S	263/0231	393	71324-20-4	HMDB03332	89644	3.40E-03	6.94E-01	6.19E-01
beta-Pseudouridine	1138	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	742	1445-07-4	HMDB00767	17802	4.16E-03	6.94E-01	5.97E-01
Taurine	32	Positif	C2H7NO3S	126/0219	886	107-35-7	HMDB00251	15891	4.51E-03	8.20E-01	5.85E-01
Uracil1	170	Négatif	C4H4N2O2	111/02	250	66-22-8	HMDB00300	17568	4.81E-03	6.94E-01	6.71E-01
N6-N6-N6-Trimethyl-L-lysine	726	Positif	C9H20N2O2	189/1598	963	19253-88-4	HMDB01325	17311	4.88E-03	9.10E-01	5.42E-01
ADP4	178	Positif	C10H15N5O10P2	428/0367	1012	58-64-0	HMDB01341	16761	5.26E-03	9.79E-01	8.82E-01
Deoxyinosine	146	Négatif	C10H12N4O4	251/0786	500	890-38-0	HMDB00071	28997	5.30E-03	8.45E-01	7.70E-01
X3-Ureidopropionic-acid3	395	Positif	C4H8N2O3	133/0608	735	462-88-4	HMDB00026	18261	5.32E-03	8.20E-01	5.85E-01
X2-O-Methylguanosine2	1120	Positif	C11H15N5O5	298/1146	476	2140-77-4	HMDB05862	19702	5.32E-03	9.79E-01	6.29E-01
N-Acetyl-L-methionine	904	Positif	C7H13NO3S	192/0689	256	65-82-7	HMDB11745	21557	5.32E-03	9.79E-01	9.55E-01
Uracil	170	Positif	C4H4N2O2	113/0346	252	66-22-8	HMDB00300	17568	5.41E-03	8.20E-01	6.29E-01
Alanine / Alanine	29 / 339	Positif	C3H7NO2	90/055	858	56-41-7.107-95-9	HMDB00161 / HMDB00056	16977 / 16958	5.47E-03	9.92E-01	8.31E-01
D-Arabinose	325	Négatif	C5H10O5	149/0455	726	147-81-9	HMDB29942	46983	5.75E-03	6.94E-01	4.05E-01
Guanosine-5-diphospho-D-mannose / Guanosine-5-diphosphoglucose	710 / 711	Négatif	C16H25N5O16P2	604/0699	1073	3123-67-9.NA	HMDB01163 / NA	15820 / NA	5.90E-03	8.98E-01	5.86E-01
L-Saccharopine1	810	Négatif	C11H20N2O6	275/1249	961	997-68-2	HMDB00279	16927	7.62E-03	8.45E-01	8.88E-01
Pyridoxamine-5-phosphate1	614	Négatif	C8H13N2O5P	247/0489	935	529-96-4	HMDB01555	18335	7.73E-03	8.45E-01	9.83E-01
X5-AMP / dGMP	972 / 175	Positif	C10H14N5O7P	348/0704	917	61-19-8.902-04-5	HMDB00045 / HMDB01044	16027 / 16192	7.77E-03	9.79E-01	5.20E-01
Guanosine-5-diphospho-L-fucose	523	Négatif	C16H25N5O15P2	588/075	1053	15839-70-0	HMDB01095	17009	7.85E-03	9.18E-01	9.83E-01
DL-alpha-Hydroxystearic-acid	1220	Négatif	C18H36O3	299/2592	92	NA	NA	NA	8.11E-03	6.94E-01	7.30E-01
Orotic-acid	227	Négatif	C5H4N2O4	155/0098	587	65-86-1	HMDB00226	16742	8.53E-03	8.98E-01	8.13E-01
Carnitine1	92	Négatif	C7H15NO3	160/0979	754	541-15-1	HMDB00062	11060	8.68E-03	8.45E-01	8.15E-01
Riboflavin1	74	Négatif	C17H20N4O6	375/131	369	83-88-5	HMDB00244	17015	1.00E-02	8.45E-01	6.26E-01
Prostaglandin-A1	605	Négatif	C20H32O4	335/2228	99	14152-28-4	HMDB02656	15545	1.00E-02	8.45E-01	8.99E-01
Leu-Pro1	1061	Négatif	C11H20N2O3	227/1401	216	87178-63-0	HMDB11175	NA	1.02E-02	7.50E-01	7.65E-01
dGMP	175	Positif	C10H14N5O7P	348/0704	953	902-04-5	HMDB01044	16192	1.06E-02	9.79E-01	5.42E-01
X5-Aminolevulinic-acid / cis-4-hydroxy-D-proline / trans-3-Hydroxy-L-proline / trans-4-Hydroxy-L-proline4	679 / 96 / 912 / 889	Positif	C5H9NO3	132/0655	860	106-60-5.2584-71-6.NA.51-35-4	HMDB01149 / HMDB060460 / HMDB05659 / HMDB00725	17549 / 16231 / 16889 / 18095	1.06E-02	9.89E-01	8.31E-01
D-Mannitol-1-phosphate	489	Positif	C6H15O9P	263/0527	911	15806-48-1	HMDB01530	16298	1.17E-02	9.54E-01	5.85E-01
N-Acetyl-L-methionine1	904	Négatif	C7H13NO3S	190/0543	259	65-82-7	HMDB11745	21557	1.18E-02	8.98E-01	8.48E-01
Propionylcarnitine	1117	Positif	C10H19NO4	218/1387	513	17298-37-2	HMDB00824	28867	1.19E-02	8.20E-01	8.76E-01
N-Acetyl-D-penicillamine	318	Négatif	C7H13NO3S	190/0543	136	15537-71-0	NA	61198	1.24E-02	8.98E-01	8.39E-01
Glycerol-3-phosphate1	1086	Négatif	C3H9O6P	171/0064	852	57-03-4	HMDB00126	15978	1.29E-02	8.15E-01	8.99E-01
Indolelactic-acid	221	Négatif	C11H11NO3	204/0666	350	1821-52-9	HMDB00671	24813	1.34E-02	9.70E-01	9.92E-01
Xanthosine	275	Positif	C10H12N4O6	285/083	727	146-80-5	HMDB00299	18107	1.36E-02	9.79E-01	5.42E-01
Hexanoyl-glycine / N-Acetyl-D-allo-leucine / N-Acetyl-L-leucine	1141 / 948 / 316	Négatif	C8H15NO3	172/0979	158	24003-67-6.54831-20-8.1188-21-2	HMDB00701 / HMDB61684 / HMDB11756	64390 / NA / 17786	1.40E-02	6.94E-01	9.20E-01
Leu-Pro	1061	Positif	C11H20N2O3	229/1547	215	87178-63-0	HMDB11175	NA	1.42E-02	8.20E-01	6.80E-01
Pyridoxamine-5-phosphate	614	Positif	C8H13N2O5P	249/0635	936	529-96-4	HMDB01555	18335	1.43E-02	9.79E-01	9.66E-01
Hexanoyl-glycine	1141	Négatif	C8H15NO3	172/0979	123	24003-67-6	HMDB00701	64390	1.44E-02	8.45E-01	6.20E-01
L-Cysteic-acid	546	Négatif	C3H7NO5S	167/9972	955	498-40-8	HMDB02757	21260	1.47E-02	7.14E-01	6.03E-01
D-Pyrroglutamic-acid2	352	Négatif	C5H7NO3	128/0353	710	4042-36-8	HMDB00805	16010	1.49E-02	9.08E-01	6.88E-01
L-Kynurenine	50	Positif	C10H12N2O3	209/0921	536	343-65-7	HMDB00684	16946	1.62E-02	9.01E-01	6.43E-01
D-Sphingosine	496	Positif	C18H37NO2	300/2897	98	NA	NA	NA	1.62E-02	9.79E-01	5.85E-01
Nicotinic-acid1	115	Négatif	C6H5NO2	122/0248	351	59-67-6	HMDB01488	15940	1.64E-02	7.73E-01	6.03E-01
Aldosterone	423	Négatif	C21H28O5	359/1864	106	52-39-1	HMDB00037	27584	1.68E-02	6.94E-01	6.19E-01
Carnitine	92	Positif	C7H15NO3	162/1125	755	541-15-1	HMDB00062	11060	1.68E-02	9.79E-01	6.43E-01
X3-Hydroxy-2-methyl-butanoic-acid / 3-Hydroxypentanoic-acid	1124 / 1139	Négatif	C5H10O3	117/0557	369	84567-98-6.10237-77-1	HMDB00410 / HMDB00531	NA / 89628	1.78E-02	8.45E-01	8.79E-01
D-Hydroxybutyric-acid1	356	Négatif	C4H8O3	103/0401	523	6168-83-8	HMDB00442	17290	1.87E-02	7.14E-01	1.56E-01
D-Penicillamine / Methionine1	1065 / 28	Positif	C5H11NO2S	150/0583	594	52-67-5.63-68-3	HMDB14997 / HMDB00696	50868 / 16643	1.88E-02	9.79E-01	5.85E-01
Riboflavin	74	Positif	C17H20N4O6	377/1456	380	83-88-5	HMDB00244	17015	2.04E-02	9.92E-01	8.64E-01
X2-Oxobutyric-acid	1179	Négatif	C4H6O3	101/0244	211	600-18-0	HMDB00005	30831	2.20E-02	6.94E-01	4.86E-01
X4-Pyridoxic-acid1	678	Négatif	C8H9NO4	182/0459	114	82-82-6	HMDB00017	17405	2.31E-02	8.60E-01	5.07E-01
Xanthine	123	Positif	C5H4N4O2	153/0407	727	69-89-6	HMDB00292	17712	2.38E-02	9.79E-01	5.85E-01
X4-Guanidinobutyric-acid	276	Positif	C5H11N3O2	146/0924	838	463-00-3	HMDB03464	15728	2.46E-02	9.92E-01	8.31E-01
X3-Hydroxypicolinic-acid	999	Positif	C6H5NO3	140/0342	199	874-24-8	HMDB113188	64342	2.55E-02	9.79E-01	6.00E-01
Prostaglandin-E1	609	Négatif	C20H34O5	353/2333	156	745-65-3	HMDB01442	15544	2.81E-02	6.94E-01	4.44E-01
Cytidine-5-diphosphocholine2	463	Positif	C14H26N4O11P2	489/1146	942	987-78-0	HMDB01413	16436	3.06E-02	8.20E-01	5.85E-01
Asparagine / Gly-Gly1	33 / 1089	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	839	70-47-3.556-50-3	HMDB00168 / HMDB11733	17196 / 17201	3.13E-02	8.58E-01	9.71E-01
Sphinganine	474	Positif	C18H39NO2	302/3054	102	764-22-7	HMDB00269	16566	3.15E-02	9.79E-01	9.18E-01
Nicotinic-acid	115	Positif	C6H5NO2	124/0393	343	59-67-6	HMDB01488	15940	3.26E-02	8.20E-01	7.08E-01
X5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1b-D-ribofuranoside1	953	Négatif	C9H14N4O5	257/0891	539	3031-94-5	HMDB01517	18406	3.26E-02	8.60E-01	5.92E-01
Cytidine	10	Positif	C9H13N3O5	244/0928	644	65-46-3	HMDB00089	17562	3.33E-02	8.20E-01	9.02E-01
Arachidic-acid	686	Négatif	C20H40O2	311/2956	80	506-30-9	HMDB02212	28822	3.51E-02	7.58E-01	5.97E-01
N-Acetylneuraminic-acid1	801	Négatif	C11H19NO7	308/0987	835	131-48-6	HMDB00230	45744	3.62E-02	8.98E-01	9.86E-01
Myristic-acid	725	Négatif	C14H28O2	227/2017	89	544-63-8	HMDB00806	28875	3.78E-02	8.58E-01	2.12E-01
X2-Hydroxyhexadecanoic-acid	1222	Négatif	C16H32O3	271/2279	98	16452-51-0	HMDB31057	65101	4.22E-02	6.94E-01	9.83E-01
Gly-Pro / Pro-Gly1	1109 / 1016	Négatif	C7H12N2O3	171/0775	783	704-15-4.2578-57-6	HMDB00721 / HMDB11178	356660 / NA	4.28E-02	6.94E-01	6.33E-01
D-Glyceric-acid	480	Négatif	C3H6O4	105/0193	706	473-81-4	HMDB00139	32398	4.40E-02	7.73E-01	6.03E-01
Purine1	613	Négatif	C5H4N4	119/0363	243	120-73-0	HMDB01366	17258	4.61E-02	8.75E-01	2.12E-01
D-Threitol / Erythritol	324 / 8	Négatif	C4H10O4	121/0506	573	2418-52-2.149-32-6	HMDB04136 / HMDB02994	48300 / 17113	4.61E-02	8.98E-01	2.95E-01
Phosphoserine	271	Négatif	C3H8NO6P	184/0016	923	407-41-0	HMDB00272	15811	4.65E-02	6.94E-01	3.10E-01
Gly-Pro	1109	Négatif	C7H12N2O3	171/0775	749	704-15-4	HMDB00721	356660	5.23E-02	6.94E-01	8.30E-01
D-Mannitol / Dulcitol	978 / 1187	Négatif	C6H14O6	181/0718	767	69-65-8.608-66-2	HMDB00765 / HMDB00107	16899 / 16813	5.23E-02	8.00E-01	4.21E-01
N-Formyl-L-methionine	579	Négatif	C6H11NO3S	176/0387	264	4289-98-9	HMDB01015	16552	5.45E-02	8.45E-01	6.03E-01
X3-Ureidopropionic-acid2	395	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	734	462-88-4	HMDB00026	18261	5.81E-02	8.81E-01	1.42E-01
X2-Methyl-2-oxovaleric-acid	888	Négatif	C6H10O3	129/0557	118	816-66-0	HMDB00695	48430	6.46E-02	6.94E-01	7.65E-01
D-Sedoheptulose-7-phosphate1	1182	Négatif	C7H15O10P	289/033	978	2646-35-7	HMDB01068	15721	7.39E-02	8.60E-01	9.68E-01
X2-Hydroxy-2-methylbutyric-acid / 2-Hydroxy-3-methylbutyric-acid / 3-Hydroxy-3-methylbutyric-acid	967 / 903 / 976	Négatif	C5H10O3	117/0557	226	3739-30-8.4026-18-0.625-08-1	HMDB01987 / HMDB00407 / HMDB00754	68454 / 60645 / 37084	7.39E-02	8.75E-01	6.19E-01
N-Acetylglycine1	308	Négatif	C4H7NO3	116/0353	562	543-24-8	HMDB00532	40410	7.50E-02	6.94E-01	8.15E-01

Cytidine-5-diphosphocholine1	463	Négatif	C14H26N4O11P2	487/1001	941	987-78-0	HMDB01413	16436	7.50E-02	7.52E-01	8.13E-01
Dihydroxyacetone-phosphate	279	Négatif	C3H7O6P	168/9907	978	57-04-5	HMDB01473	16108	7.50E-02	8.98E-01	8.13E-01
L-Cysteine	26	Négatif	C3H7NO2S	120/0125	938	52-90-4	HMDB00574	17561	8.00E-02	6.94E-01	5.73E-01
N-Acetyl-DL-serine / O-Acetyl-L-serine	955 / 734	Négatif	C5H9NO4	146/0459	665	NA.5147-00-2	HMDB02931 / HMDB03011	NA / 17981	8.00E-02	7.75E-01	9.71E-01
Prostaglandin-E11	609	Négatif	C20H34O5	353/2333	101	745-65-3	HMDB01442	15544	8.00E-02	8.98E-01	6.19E-01
Dihydrofolic-acid	702	Positif	C19H21N7O6	444/1626	974	4033-27-6	HMDB01056	15633	8.02E-02	8.20E-01	5.20E-01
Gly-Pro / Pro-Gly3	1109 / 1016	Positif	C7H12N2O3	173/0921	785	704-15-4.2578-57-6	HMDB00721 / HMDB11178	356660 / NA	8.18E-02	8.20E-01	5.85E-01
Lignoceric-acid	550	Négatif	C24H48O2	367/3582	78	557-59-5	HMDB02003	28866	8.44E-02	7.14E-01	6.19E-01
Uric-acid	274	Négatif	C5H4N4O3	167/021	752	69-93-2	HMDB00289	17775	8.84E-02	8.98E-01	7.70E-01
beta-Pseudouridine2	1138	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	704	1445-07-4	HMDB00767	17802	9.15E-02	7.73E-01	5.88E-01
Citraconic-acid / Glutaconic-acid / Itaconic-acid / Mesaconic-acid	451 / 516 / 540 / 562	Négatif	C5H6O4	129/0193	911	704-15-4.98-23-7.1724-02-3.97-65-4.498-24-8	HMDB00634 / HMDB00620 / HMDB02092 / HMDB00749	17626 / 15670 / 30838 / 16600	9.15E-02	8.14E-01	6.19E-01
X5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1b-D-ribofuranoside	953	Positif	C9H14N4O5	259/1037	539	3031-94-5	HMDB01517	18406	9.27E-02	9.79E-01	5.85E-01
L-a-Glycerophosphorylcholine	716	Positif	C8H20NO6P	258/1101	851	28319-77-9	HMDB00086	16870	9.47E-02	8.20E-01	7.71E-01
Gly-Pro / Pro-Gly2	1109 / 1016	Négatif	C7H12N2O3	171/0775	806	704-15-4.2578-57-6	HMDB00721 / HMDB11178	356660 / NA	9.52E-02	6.94E-01	8.30E-01
N-Acetyl-L-alanine	574	Positif	C5H9NO3	132/0655	488	97-69-8	HMDB00766	40992	1.02E-01	9.79E-01	8.31E-01
GDP	184	Positif	C10H15N5O11P2	444/0316	1073	146-91-8	HMDB01201	17552	1.02E-01	9.92E-01	5.85E-01
X5-Aminopyridine-3-carboxylic-acid / 6-Aminopyridine-3-carboxylic-acid2	1071 / 1079	Positif	C6H6N2O2	139/0502	626	.24242-19-1.3167-49-5	NA / NA	NA / NA	1.02E-01	9.79E-01	5.85E-01
Acetyl-L-carnitin	86	Positif	C9H17NO4	204/123	601	3040-38-8	HMDB00201	73024	1.02E-01	9.79E-01	7.58E-01
D-Glucosamine-6-phosphate3	701	Positif	C6H14NO8P	260/053	955	3616-42-0	HMDB01254	15873	1.04E-01	8.20E-01	4.31E-01
Histidine1	22	Négatif	C6H9N3O2	154/0622	802	71-00-1	HMDB00177	15971	1.07E-01	6.94E-01	6.19E-01
L-Pyroglutamic-acid4	950	Positif	C5H7NO3	130/0499	838	98-79-3	HMDB00267	18183	1.08E-01	9.79E-01	7.94E-01
D-Glutamine / L-Glutamine	247 / 24	Positif	C5H10N2O3	147/0764	838	5959-95-5.56-85-9	HMDB03423 / HMDB00641	17061 / 1805	1.08E-01	9.79E-01	7.97E-01
Gly-Pro / Pro-Gly	1109 / 1016	Positif	C7H12N2O3	173/0921	808	704-15-4.2578-57-6	HMDB00721 / HMDB11178	356660 / NA	1.10E-01	9.79E-01	9.66E-01
UDP	171	Positif	C9H14N2O12P2	405/0095	1017	58-98-0	HMDB00295	17659	1.14E-01	8.20E-01	9.41E-01
Ergothioneine	541	Positif	C9H15N3O2S	230/0958	824	497-30-3	HMDB03045	4828	1.17E-01	9.92E-01	6.84E-01
Picolinic-acid	231	Positif	C6H5NO2	124/0393	453	98-98-6	HMDB02243	28747	1.20E-01	8.88E-01	9.82E-01
cis-5-8-11-14-17-Eicosapentaenoic-acid	448	Négatif	C20H30O2	301/2173	84	10417-94-4	HMDB01999	28364	1.22E-01	8.58E-01	3.21E-01
Guanidinosuccinic-acid	282	Positif	C5H9N3O4	176/0666	927	6133-30-8	HMDB03157	17072	1.26E-01	8.20E-01	5.42E-01
Imidazoleacetic-acid	219	Positif	C5H6N2O2	127/0502	691	645-65-8	HMDB02024	16974	1.27E-01	8.20E-01	9.82E-01
X9-12-dioxo-dodecanoic-acid	1190	Négatif	C12H20O4	227/1289	116	NA	NA	NA	1.30E-01	6.94E-01	7.30E-01
Prostaglandin-E12	609	Négatif	C20H34O5	353/2333	122	745-65-3	HMDB01442	15544	1.32E-01	6.94E-01	6.03E-01
X2-Deoxycytidine-5-monophosphate	377	Négatif	C9H14N3O7P	306/0497	922	1032-65-1	HMDB01202	15918	1.32E-01	7.14E-01	6.92E-01
L-Serine1	544	Négatif	C10H16N4O3	239/115	784	584-85-0	HMDB00194	18323	1.32E-01	4.82E-02	8.64E-01
L-Threonine-acid	552	Négatif	C4H8O5	135/0299	739	734111	HMDB00943	15908	1.32E-01	6.94E-01	1.42E-01
Alpha-D-Aminoadipic-acid2	113	Négatif	C6H11NO4	160/0615	922	542-32-5	HMDB00510	37024	1.32E-01	9.70E-01	9.71E-01
Myo-inositol1	76	Négatif	C6H12O6	179/0561	977	87-89-8	HMDB00211	17268	1.34E-01	8.45E-01	1.42E-01
X5-Deoxy-5-methylthio-adenosine	404	Positif	C11H15N5O3S	298/0968	172	2457-80-9	HMDB01173	17509	1.38E-01	9.87E-01	5.42E-01
Purine	613	Positif	C5H4N4	121/0509	246	120-73-0	HMDB01366	17258	1.44E-01	9.79E-01	5.20E-01
Galacturonic-acid / D-Galacturonic-acid / D-Glucuronic-acid	959 / 478 / 992	Négatif	C6H10O7	193/0354	944	14982-50-4.14982-50-4.6556-12-3	HMDB02545 / HMDB02545 / HMDB00127	47962 / 47962 / 24298	1.44E-01	6.94E-01	8.48E-01
Myo-inositol	76	Négatif	C6H12O6	179/0561	1013	87-89-8	HMDB00211	17268	1.44E-01	8.98E-01	2.61E-01
DL-Leucine / Isoleucine / Leucine / L-Norleucine	216 / 25 / 34 / 1003	Positif	C6H13NO2	132/1019	578	5699-54-7.73-32-5.61-90-5.327-57-1	HMDB03640 / HMDB00172 / HMDB00687 / HMDB01645	15604 / 17191 / 15603 / 18347	1.45E-01	9.92E-01	5.85E-01
DL-3-Aminoisobutyric-acid / Aminobutyric-acid1	487 / 88	Négatif	C4H9NO2	102/056	868	144-90-1.56-12-2	HMDB03911 / HMDB00112	27389 / 16865	1.47E-01	8.45E-01	3.94E-01
Glycyl-L-leucine	708	Négatif	C8H16N2O3	187/1088	583	869-19-2	HMDB00759	185298	1.57E-01	8.58E-01	6.88E-01
Maltotetraose / Stachyose	558 / 68	Négatif	C24H42O21	665/2146	1013	34612-38-9.470-55-3	HMDB01296 / HMDB03553	61988 / 17164	1.57E-01	8.98E-01	2.12E-01
X3-AMP2	176	Positif	C10H14N5O7P	348/0704	814	84-21-9	HMDB03540	28931	1.64E-01	9.92E-01	5.85E-01
Guanidinosuccinic-acid1	282	Négatif	C5H9N3O4	174/052	928	6133-30-8	HMDB03157	17072	1.67E-01	6.94E-01	6.19E-01
L-Glutathione-oxidized1	811	Négatif	C20H32N6O12S2	611/1447	1049	27025-41-8	HMDB03337	17858	1.67E-01	7.73E-01	3.94E-01
Thymine1	1059	Négatif	C5H6N2O2	125/0357	139	65-71-4	HMDB00262	17821	1.67E-01	7.73E-01	6.19E-01
Galactonic-acid / Gluconic-acid1	1053 / 831	Négatif	C6H12O7	195/051	853	13382-27-9.526-95-4	HMDB00565 / HMDB00625	16534 / 33198	1.67E-01	8.58E-01	8.15E-01
D-Raffinose	104	Négatif	C18H32O16	503/1618	1014	512-69-6	HMDB03213	397485	1.67E-01	8.98E-01	2.12E-01
Melibiose / Lactose1	159 / 759	Négatif	C12H22O11	341/1089	1013	585-99-9.63-42-3	HMDB00048 / HMDB00186	28053 / 36219	1.67E-01	8.98E-01	2.12E-01
Palmitic-acid	228	Négatif	C16H32O2	255/2329	87	57-10-3	HMDB00220	15756	1.78E-01	8.98E-01	1.42E-01
Inosine1	54	Négatif	C10H12N4O5	267/0735	626	58-63-9	HMDB00195	17596	1.85E-01	7.14E-01	1.42E-01
Biotin1	62	Négatif	C10H16N2O3S	243/0809	613	58-85-5	HMDB00030	15956	1.87E-01	8.45E-01	6.26E-01
D-allo-Threonine / L-Homoserine / Threonine1	471 / 20 / 31	Négatif	C4H9NO3	118/051	799	24830-94-2.672-15-1.72-19-5	HMDB04041 / HMDB00719 / HMDB00167	28718 / 15699 / 16857	1.90E-01	8.45E-01	8.64E-01
D-Xylose	109	Négatif	C5H10O5	149/0456	805	58-86-6	HMDB00098	53455	1.90E-01	9.88E-01	5.89E-01
N6-Acetyl-L-lysine2	728	Positif	C8H16N2O3	189/1234	723	692-04-6	HMDB00206	17752	1.91E-01	8.20E-01	8.31E-01
Nicotinamide	581	Positif	C6H6N2O	123/0553	164	98-92-0	HMDB01406	17154	1.91E-01	8.66E-01	5.42E-01
Maltotetraose	558	Positif	C24H42O21	667/2291	1012	34612-38-9	HMDB01296	61988	1.91E-01	9.79E-01	4.31E-01
Sarcosine2	168	Négatif	C3H7NO2	88/0404	734	107-97-1	HMDB00271	15611	1.92E-01	9.44E-01	6.19E-01
Creatine1	694	Négatif	C4H9N3O2	130/0622	814	57-00-1	HMDB00064	16919	2.01E-01	7.14E-01	6.03E-01
Diglycolic-acid / Malic-acid1	1213 / 15	Négatif	C4H6O5	133/0142	931	NA.6915-15-7	NA / HMDB00744	NA / 6650	2.07E-01	8.45E-01	6.19E-01
Prostaglandin-A2 / Prostaglandin-B2	606 / 608	Négatif	C20H30O4	333/2071	111	13345-50-1.13367-85-6	HMDB02752 / HMDB04236	27820 / 28099	2.07E-01	8.58E-01	8.11E-01
N-Acetylneuraminic-acid2	801	Positif	C11H19NO9	310/1133	834	131-48-6	HMDB00230	45744	2.07E-01	9.79E-01	8.56E-01
Uridine-5-diphosphogalactose	644	Négatif	C15H24N2O17P2	565/0477	1018	2956-16-3	HMDB00302	67119	2.09E-01	6.94E-01	9.83E-01
Inosine	54	Positif	C10H12N4O5	269/0881	625	58-63-9	HMDB00195	17596	2.12E-01	8.66E-01	1.71E-01
X5-Aminolevulinic-acid / cis-4-hydroxy-D-proline / trans-3-Hydroxy-L-proline / trans-4-hydroxy-L-proline3	679 / 96 / 912 / 889	Positif	C5H9NO3	132/0655	824	106-60-5.2584-71-6.NA.51-35-4	HMDB01149 / HMDB06460 / HMDB59659 / HMDB00725	17549 / 16231 / 16889 / 18095	2.12E-01	8.20E-01	5.20E-01
Galactonic-acid / Gluconic-acid	1053 / 831	Négatif	C6H12O7	195/051	872	13382-27-9.526-95-4	HMDB00565 / HMDB00625	16534 / 33198	2.18E-01	8.45E-01	8.30E-01
L-Cystine	267	Positif	C6H12N2O4S2	241/0312	941	56-89-3	HMDB00192	16283	2.27E-01	8.20E-01	5.85E-01

Trehalose / Isomaltose / Melibiose / Lactose	469 / 155 / 159 / 759	Négatif	C12H22O11	341/1089	977	99-20-7.499-40-1.585-99-9.63-42-3	HMD800975 / HMD802923 / HMD800048 / HMD800186	16551 / 28189 / 28053 / 36219	2.36E-01	8.60E-01	1.42E-01
Inosine2	54	Négatif	C10H12N4O5	267/0735	704	58-63-9	HMD800195	17596	2.37E-01	6.94E-01	2.12E-01
Capric-acid	45	Négatif	C10H20O2	171/1391	99	334-48-5	HMD800511	30813	2.38E-01	7.14E-01	8.47E-01
D-Raffinose1	104	Négatif	C18H32O16	503/1618	976	512-69-6	HMD803213	397485	2.41E-01	8.45E-01	1.42E-01
Hippuric-acid	117	Négatif	C9H9NO3	178/051	256	495-69-2	HMD800714	18089	2.44E-01	8.29E-01	7.30E-01
Arabitol	659	Négatif	C5H12O5	151/0612	708	488-82-4	HMD800568	893310	2.44E-01	8.45E-01	4.86E-01
Cytidine2	10	Positif	C9H13N3O5	244/0928	614	65-46-3	HMD800089	17562	2.50E-01	8.20E-01	7.01E-01
X5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1b-D-ribofuranosyl-5-monophosphate1	653	Négatif	C9H15N4O8P	337/0555	934	NA	NA	NA	2.53E-01	6.94E-01	3.98E-01
Isomaltose / Melibiose / Lactose	155 / 159 / 759	Positif	C12H22O11	343/1235	975	499-40-1.585-99-9.63-42-3	HMD8002923 / HMD800048 / HMD800186	28189 / 28053 / 36219	2.57E-01	9.79E-01	4.31E-01
Muramic-acid3	565	Positif	C9H17NO7	252/1078	823	1114-41-6	HMD803254	28118	2.58E-01	8.20E-01	5.20E-01
N-Acetyl-D-glucosamine/ N-Acetylglactosamine/ N-Acetylmannosamine	572 / 161 / 162	Négatif	C8H15NO6	220/0827	672	7512-17-6.1811-31-0.3615-17-6	HMD800215 / HMD800212 / HMD801129	506227 / 40356 / 63154	2.60E-01	6.94E-01	8.66E-01
Asp-Phe	1160	Négatif	C13H16N2O5	279/0986	799	NA	HMD828760	NA	2.60E-01	8.98E-01	6.19E-01
L-Cystine1	267	Négatif	C6H12N2O4S2	239/0166	938	56-89-3	HMD800192	16283	2.64E-01	6.94E-01	6.19E-01
Behenic-acid	435	Négatif	C22H44O2	339/3269	79	112-85-6	HMD800944	28941	2.64E-01	6.94E-01	9.86E-01
Prostaglandin-F1alpha	611	Négatif	C20H36O5	355/249	106	745-62-0	HMD802685	28852	2.64E-01	8.26E-01	8.15E-01
Adenine1	111	Négatif	C5H5N5	134/0472	368	73-24-5	HMD800034	16708	2.64E-01	8.45E-01	7.30E-01
Taurocholic-acid1	2	Négatif	C26H45NO7S	514/2844	123	81-24-3	HMD800036	28865	2.64E-01	8.75E-01	6.88E-01
beta-Pseudouridine1	1138	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	658	1445-07-4	HMD800767	17802	2.64E-01	8.98E-01	8.15E-01
DL-Tryptophan / L-Tryptophan	289 / 292	Positif	C11H12N2O2	205/0972	599	54-12-6.73-22-3	HMD803096 / HMD800929	27897 / 16828	2.66E-01	9.79E-01	5.85E-01
DL-3-Aminoisobutyric-acid / Aminoisobutyric-acid	487 / 88	Positif	C4H9NO2	104/0706	869	144-90-1.56-12-2	HMD803911 / HMD800112	27389 / 16865	2.66E-01	9.79E-01	5.85E-01
Adenine2	111	Positif	C5H5N5	136/0618	376	73-24-5	HMD800034	16708	2.69E-01	9.79E-01	4.31E-01
X3-Hydroxy-3-methylglutaric-acid1	676	Négatif	C6H10O5	161/0455	891	503-49-1	HMD800355	16831	2.72E-01	7.14E-01	1.42E-01
L-Glutamic-acid1	222	Négatif	C5H9NO4	146/0459	878	56-86-0	HMD800148	16015	2.72E-01	8.45E-01	6.19E-01
N-Methyl-D-aspartic-acid1	270	Négatif	C5H9NO4	146/0459	878	6384-92-5	HMD802393	31882	2.72E-01	8.45E-01	6.19E-01
L-Citrulline	91	Positif	C6H13N3O3	176/1103	874	372-75-8	HMD800904	16349	2.80E-01	8.20E-01	8.70E-01
UDP2	171	Négatif	C9H14N2O12P2	402/9949	960	58-98-0	HMD800295	17659	3.06E-01	7.14E-01	6.19E-01
X3-Amino-3-4-hydroxyphenyl-propanoic-acid/ Tyrosine	1126 / 36	Négatif	C9H11NO3	180/0666	709	.6049-54-3.60-18-4	NA / HMD800158	16939 / 17895	3.06E-01	8.45E-01	8.32E-01
D-Penicillamine / Methionine / S-ethyl-L-cysteine	1065 / 28 / 1095	Négatif	C5H11NO2S	148/0438	583	52-67-5.63-68-3.2629-59-6	HMD814997 / HMD806696 / NA	50868 / 16643 / NA	3.06E-01	8.45E-01	8.64E-01
X2-hydroxycaproic-acid1	194	Négatif	C6H12O3	131/0713	123	6064-63-7	HMD801624	86542	3.06E-01	9.65E-01	8.01E-01
Alpha-D-Amino adipic-acid1	113	Négatif	C6H11NO4	160/0615	878	542-32-5	HMD800510	37024	3.07E-01	6.94E-01	5.73E-01
Uridine-5-diphosphoglucuronic-acid	645	Négatif	C15H22N2O18P2	579/027	1125	2616-64-0	HMD800935	17200	3.07E-01	6.94E-01	7.30E-01
GMP1	185	Négatif	C10H14N5O8P	362/0507	981	85-32-5	HMD801397	17345	3.07E-01	6.94E-01	8.99E-01
X3-Methylcrotonyl-glycine / N-Tiglylglycine1	1137 / 1136	Négatif	C7H11NO3	156/0666	241	33008-07-0.35842-45-6	HMD800459 / HMD800959	68499 / 73018	3.11E-01	6.94E-01	9.90E-01
N-Acetyl-L-alanine1	574	Négatif	C5H9NO3	130/051	520	97-69-8	HMD800766	40992	3.11E-01	8.45E-01	6.19E-01
Allantoin	426	Négatif	C4H6N4O3	157/0367	757	97-59-6	HMD800462	15676	3.11E-01	8.98E-01	7.65E-01
X6-Biotperin2	407	Positif	C9H11N5O3	238/0935	677	22150-76-1	HMD800468	63931	3.13E-01	8.20E-01	7.71E-01
Methylimidazoleacetic-acid	224	Positif	C6H8N2O2	141/0659	539	2625-49-2	HMD802820	1606	3.13E-01	8.25E-01	9.62E-01
L-Glutathione-oxidized	811	Positif	C20H32N6O12S2	613/1592	1049	27025-41-8	HMD803337	17858	3.13E-01	9.79E-01	5.20E-01
X5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1b-D-ribofuranosyl-5-monophosphate2	653	Positif	C9H15N4O8P	339/07	933	NA	NA	NA	3.14E-01	8.20E-01	5.42E-01
X2-5-Dihydroxybenzaldehyde / Salicylic-acid	370 / 167	Négatif	C7H6O3	137/0244	118	1194-98-5.69-72-7	HMD804062 / HMD801895	28508 / 16914	3.18E-01	9.70E-01	3.15E-01
L-Anserine	544	Positif	C10H16N4O3	241/1295	785	584-85-0	HMD800194	18323	3.18E-01	6.61E-02	6.00E-01
L-Citrulline1	91	Négatif	C6H13N3O3	174/0884	876	372-75-8	HMD800904	16349	3.22E-01	6.94E-01	5.73E-01
Serine2	37	Positif	C3H7NO3	106/0499	850	56-45-1	HMD800187	17115	3.25E-01	9.79E-01	8.31E-01
X6-Biotperin1	407	Négatif	C9H11N5O3	236/0789	677	22150-76-1	HMD800468	63931	3.27E-01	7.14E-01	6.03E-01
a-Ketoglutaric-acid1	422	Négatif	C5H6O5	145/0142	901	328-50-7	HMD800208	30915	3.38E-01	9.21E-01	8.48E-01
Biotin	62	Positif	C10H16N2O3S	245/0955	616	58-85-5	HMD800030	15956	3.39E-01	8.20E-01	7.58E-01
Cytidine-5-diphosphocholine	463	Positif	C14H26N4O11P2	489/1146	990	987-78-0	HMD801413	16436	3.41E-01	8.20E-01	6.20E-01
Phenylalanine	27	Positif	C9H11NO2	166/0863	491	63-91-2	HMD800159	17295	3.46E-01	9.79E-01	6.20E-01
dAMP	144	Positif	C10H14N5O6P	332/0755	824	653-63-4	HMD800905	17713	3.58E-01	8.25E-01	9.37E-01
Cytidine1	10	Négatif	C9H13N3O5	242/0783	614	65-46-3	HMD800089	17562	3.63E-01	7.75E-01	7.58E-01
Adonitol / Arabitol	684 / 713	Négatif	C5H12O5	151/0612	679	488-81-3.7643-75-6	HMD800508 / HMD801851	15963 / 18403	3.63E-01	8.45E-01	5.43E-01
cis-8-11-14-Eicosatrienoic-acid	449	Négatif	C20H34O2	305/2486	83	1783-84-2	HMD802925	53486	3.63E-01	8.58E-01	2.12E-01
Phenylalanine1	27	Négatif	C9H11NO2	164/0717	490	63-91-2	HMD800159	17295	3.68E-01	9.21E-01	6.26E-01
Hexadecanedioic-acid	264	Négatif	C16H30O4	285/2071	123	505-54-4	HMD800672	73722	3.71E-01	8.98E-01	3.21E-01
Guanidinediacetic-acid	263	Positif	C3H7N3O2	118/0611	865	352-97-6	HMD800128	16344	3.74E-01	8.20E-01	8.31E-01
Adenosine2	6	Positif	C10H13N5O4	268/1104	361	58-61-7	HMD800050	16335	3.74E-01	9.31E-01	9.47E-01
D-Pyroglutamic-acid1	352	Négatif	C5H7NO3	128/0353	637	4042-36-8	HMD800805	16010	3.77E-01	9.70E-01	6.26E-01
Dehydroascorbic-acid	262	Négatif	C6H6O6	173/0092	910	490-83-5	HMD801264	17242	3.77E-01	8.69E-01	6.88E-01
Panthenol1	253	Négatif	C9H19NO4	204/1241	128	81-13-0	HMD804231	27373	3.77E-01	8.75E-01	8.39E-01
N-Acetylglucine	308	Négatif	C4H7NO3	116/0353	665	543-24-8	HMD800532	40410	3.80E-01	6.94E-01	9.86E-01
Adenosine-5-diphosphoglucose2	419	Positif	C16H25N5O15P2	590/0895	934	2140-58-1	HMD806557	15751	3.88E-01	9.79E-01	5.85E-01
Muramic-acid	565	Positif	C9H17NO7	252/1078	864	1114-41-6	HMD803254	28118	3.88E-01	8.20E-01	5.20E-01
D-Ribose-1-phosphate / D-Ribose-5-phosphate / D-Ribulose-5-phosphate / D-Xylulose-5-phosphate1	494 / 152 / 495 / 497	Négatif	C5H10O8P	229/0119	924	14075-00-4.3615-55-2.4151-19-3.4212-65-1	HMD801489 / HMD801548 / HMD800618 / HMD800868	16300 / 52742 / 17797 / 16332	3.90E-01	6.94E-01	1.42E-01
Aminobutyric-acid2	88	Négatif	C4H9NO2	102/0561	893	56-12-2	HMD800112	16865	3.90E-01	8.86E-01	7.64E-01
GDP1	184	Négatif	C10H15N5O11P2	442/0171	1061	146-91-8	HMD801201	17552	3.90E-01	9.70E-01	9.83E-01
Imidazoleacetic-acid1	219	Négatif	C5H6N2O2	125/0356	704	645-65-8	HMD802024	16974	3.97E-01	8.45E-01	9.83E-01
UMP1	172	Négatif	C9H13N2O9P	323/0286	917	58-97-9	HMD800288	16695	4.00E-01	8.76E-01	9.90E-01
Phosphonoacetic-acid1	601	Négatif	C2H5O5P	138/9802	924	4408-78-0	HMD804110	15732	4.04E-01	6.94E-01	1.42E-01
Medroxyprogesterone	722	Négatif	C22H32O3	343/2279	86	520-85-4	HMD801939	6715	4.04E-01	8.00E-01	8.20E-01
Adenosine1	6	Négatif	C10H13N5O4	266/0895	369	58-61-7	HMD800050	16335	4.04E-01	8.45E-01	9.80E-01
Alanine/ Alanine1	29 / 339	Négatif	C3H7NO2	88/0404	859	56-41-7.107-95-9	HMD800161 / HMD800056	16977 / 16958	4.04E-01	9.89E-01	8.89E-01
L-Ascorbic-acid-2-sulfate	789	Négatif	C6H8O9S	254/9816	1179	NA	HMD806049	NA	4.16E-01	7.14E-01	6.19E-01

D-Ribose-1-phosphate/D-Ribose-5-phosphate / D-Ribulose-5-phosphate / D-Xylulose-5-phosphate	494 / 152 / 495 / 497	Négatif	C5H11O8P	229/0119	956	14075-00-4.3615-55-2.4151-19-3.4212-65-1	HMDB01489 / HMDB01548 / HMDB00618 / HMDB00868	16300 / 52742 / 17797 / 16332	4.17E-01	8.45E-01	6.19E-01
Hypoxanthine1	986	Négatif	C5H4N4O	135/0312	532	68-94-0	HMDB00157	17368	4.17E-01	8.45E-01	6.88E-01
Dimethyl-oxalate/ Erythrone-1-4-lactone / Methylmalonic-acid / Succinic-acid	966 / 975 / 225 / 18	Négatif	C4H6O4	117/0193	928	553-90-2.17675-99-9.516-05-2.110-15-6	NA / HMDB00349 / HMDB00202 / HMDB00254	6859 / 290972 / 30860 / 15741	4.17E-01	8.45E-01	8.64E-01
N6-Acetyl-L-lysine	728	Positif	C8H16N2O3	189/1234	766	692-04-6	HMDB00206	17752	4.20E-01	8.20E-01	9.62E-01
Melibiose / Lactose	159 / 759	Positif	C12H22O11	343/1235	1013	585-99-9.63-42-3	HMDB00048 / HMDB00186	28053 / 36219	4.20E-01	9.79E-01	5.20E-01
Malonic-acid	557	Négatif	C3H4O4	103/0037	913	141-82-2	HMDB00691	30794	4.24E-01	6.94E-01	8.66E-01
O-Phosphorylethanolamine1	735	Négatif	C2H8NO4P	140/0118	947	1071-23-4	HMDB00224	17553	4.24E-01	8.97E-01	6.19E-01
ATP / dGTP	55 / 182	Négatif	C10H16N5O13P3	505/9885	989	56-65-5.2564-35-4	HMDB00538 / HMDB01440	15422 / 16497	4.26E-01	8.45E-01	9.71E-01
Adenosine-5-diphosphoglucose1	419	Négatif	C16H25N5O15P2	588/075	934	2140-58-1	HMDB06557	15751	4.26E-01	8.75E-01	6.88E-01
Gluconic-acid	831	Négatif	C6H12O7	195/051	816	526-95-4	HMDB00625	33198	4.27E-01	8.45E-01	7.36E-01
Thymine	1059	Négatif	C5H6N2O2	125/0357	177	65-71-4	HMDB00262	17821	4.32E-01	7.73E-01	6.88E-01
Riboflavin-5-monophosphate	741	Négatif	C17H21N4O9P	455/0973	754	146-17-8	HMDB01520	17621	4.35E-01	8.98E-01	8.64E-01
X12-Hydroxydodecanoic-acid/DL-beta-Hydroxyglutaric-acid	135 / 1219	Négatif	C12H24O3	215/1653	95	505-95-3.1883-13-2	HMDB02059 / HMDB00387	39567 / 36206	4.41E-01	7.28E-01	8.64E-01
X4-Nitrophenol	399	Négatif	C6H5NO3	138/0197	121	100-02-7	HMDB01232	16836	4.41E-01	9.21E-01	8.32E-01
Pipecolic-acid1	272	Négatif	C6H11NO2	128/0717	666	535-75-1	HMDB00070	17964	4.43E-01	7.14E-01	6.03E-01
D-2-Hydroxyglutaric-acid	803	Négatif	C5H8O5	147/0299	932	2889-31-8	HMDB00606	32796	4.52E-01	8.75E-01	4.21E-01
X1-methyl-guanine / 7-methylguanin2	121 / 7	Positif	C6H7N5O	166/0723	440	938-85-2.578-76-7	HMDB03282 / HMDB00897	21803 / 28664	4.54E-01	9.31E-01	8.31E-01
X7-8-Dihydro-L-biopterin3	409	Positif	C9H13N5O3	240/1091	670	6779-87-9	HMDB00038	64277	4.56E-01	8.80E-01	4.31E-01
Creatine	694	Positif	C4H9N3O2	132/0768	817	57-00-1	HMDB00064	16919	4.58E-01	8.20E-01	5.42E-01
ADP3	178	Positif	C10H15N5O10P2	428/0367	934	58-64-0	HMDB01341	16761	4.58E-01	8.20E-01	5.85E-01
Chlorogenic-acid	39	Négatif	C16H18O9	353/0878	761	327-97-9	HMDB03164	16112	4.64E-01	6.94E-01	3.98E-01
Galacturonic-acid / D-Glucuronic-acid	959 / 992	Négatif	C6H10O7	193/0354	911	14982-50-4.6556-12-3	HMDB02545 / HMDB00127	47962 / 24298	4.64E-01	6.94E-01	8.30E-01
Histidine	22	Positif	C6H9N3O2	156/0768	801	71-00-1	HMDB00177	15971	4.67E-01	8.20E-01	5.42E-01
Panthenol	253	Négatif	C9H19NO4	204/1241	162	81-13-0	HMDB04231	27373	4.68E-01	7.75E-01	9.83E-01
Ornithine2	163	Négatif	C5H12N2O2	131/0826	1030	70-26-8	HMDB00214	15729	4.72E-01	9.21E-01	6.26E-01
N-Acetyl-D-glucosamine-1-phosphate / N-Acetyl-D-glucosamine-6-phosphate	569 / 573	Négatif	C8H16NO9P	300/049	923	901851-43-2.102029-88-9	HMDB01367 / HMDB01062	7125 / 15783999999	4.93E-01	8.97E-01	8.48E-01
N-Acetyl-L-tyrosine	730	Négatif	C11H13NO4	222/0772	481	537-55-3	HMDB00866	21563	4.94E-01	6.94E-01	8.32E-01
X4-Hydroxybenzaldehyde	294	Négatif	C7H6O2	121/0295	130	123-08-0	HMDB11718	17597	4.95E-01	6.94E-01	6.26E-01
X4-Amino-nicotinic-acid1	1073	Négatif	C6H6N2O2	137/0357	531	7418-65-7	NA	NA	5.03E-01	8.98E-01	6.19E-01
X9-cis-Retinal / trans-Retinal	664 / 424	Positif	C20H28O	285/2213	82	514-85-2.116-31-4	HMDB06218 / HMDB01358	527124 / 179	5.04E-01	8.20E-01	5.85E-01
Adenosine-diphosphate-ribose2	140	Positif	C15H23N5O14P2	560/079	925	20762-30-5	HMDB01178	16960	5.04E-01	8.20E-01	5.85E-01
Trehalose / Isomaltose / Sucrose / Lactose	469 / 155 / 64 / 759	Négatif	C12H22O11	341/1089	903	99-20-7.499-40-1.57-50-1.63-42-3	HMDB00975 / HMDB02923 / HMDB00258 / HMDB00186	16551 / 28189 / 17992 / 36219	5.13E-01	6.94E-01	2.12E-01
Deoxycholic-acid	48	Négatif	C24H40O4	391/2854	163	83-44-3	HMDB00626	28834	5.13E-01	6.94E-01	5.94E-01
Ursodeoxycholic-acid	235	Négatif	C24H40O4	391/2854	163	128-13-2	HMDB00946	9907	5.13E-01	6.94E-01	5.94E-01
X3-Ureidopropionic-acid1	395	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	707	462-88-4	HMDB00026	18261	5.13E-01	6.94E-01	6.20E-01
Creatinine1	997	Négatif	C4H7N3O	112/0516	397	60-27-5	HMDB00562	16737	5.13E-01	7.14E-01	9.20E-01
D-Sedoheptulose-7-phosphate	1182	Négatif	C7H15O10P	289/033	1008	2646-35-7	HMDB01068	15721	5.13E-01	7.14E-01	9.83E-01
ADP1	178	Négatif	C10H15N5O10P2	426/0221	935	58-64-0	HMDB01341	16761	5.13E-01	7.50E-01	6.33E-01
Asparagine / Gly-Gly2	33 / 1089	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	901	70-47-3.556-50-3	HMDB00168 / HMDB11733	17196 / 17201	5.13E-01	8.45E-01	8.30E-01
Arginine1	35	Négatif	C6H14N4O2	173/1044	1031	74-79-3	HMDB00517	16467	5.13E-01	9.21E-01	7.30E-01
Sarcosine1	168	Négatif	C3H7NO2	88/0404	799	107-97-1	HMDB00271	15611	5.26E-01	8.45E-01	7.58E-01
X21-Deoxycortisol / Corticosterone	206 / 338	Négatif	C21H30O4	345/2071	99	641-77-0.50-22-6	HMDB04030 / HMDB01547	NA / 16827	5.27E-01	6.94E-01	5.88E-01
Isomaltose / Sucrose / Lactose	155 / 64 / 759	Positif	C12H22O11	343/1235	900	499-40-1.57-50-1.63-42-3	HMDB02923 / HMDB00258 / HMDB00186	28189 / 17992 / 36219	5.29E-01	8.20E-01	4.31E-01
N-Acetyl-Asp-Glu	570	Négatif	C11H16N2O8	303/0834	1013	NA	NA	NA	5.41E-01	6.94E-01	5.97E-01
X2-Aminobenzoic-acid / Trigonelline3	132 / 748	Positif	C7H7NO2	138/055	665	118-92-3.535-83-1	HMDB01123 / HMDB00875	30754 / 18123	5.45E-01	8.20E-01	6.61E-01
Cystathionine / L-Cystathionine	127 / 259	Positif	C7H14N2O4S	223/0747	943	535-34-2.56-88-2	HMDB00455 / HMDB00099	NA / 17482	5.52E-01	8.20E-01	8.31E-01
Taurocholic-acid	2	Positif	C26H45NO7S	516/299	124	81-24-3	HMDB00036	28865	5.52E-01	9.79E-01	8.31E-01
X9-Methyluric-acid	1032	Négatif	C6H6N4O3	181/0367	689	55441-71-9	HMDB01973	NA	5.53E-01	6.94E-01	5.04E-01
X10-hydroxydecanoic-acid/3-hydroxydecanoic-acid	193 / 192	Négatif	C10H20O3	187/134	104	.1679-53-4.14292-26-3	NA / HMDB02203	17409 / 37371	5.53E-01	8.98E-01	7.30E-01
N6-Acetyl-L-lysine1	728	Négatif	C8H16N2O3	187/1088	720	692-04-6	HMDB00206	17752	5.58E-01	8.00E-01	9.71E-01
L-Saccharopine	810	Positif	C11H20N2O6	277/1394	986	997-68-2	HMDB00279	16927	5.61E-01	8.20E-01	5.20E-01
Deoxycytidine	145	Positif	C9H13N3O4	228/0979	599	951-77-9	HMDB00014	15698	5.61E-01	8.20E-01	5.85E-01
Lysine	23	Positif	C6H14N2O2	147/1128	1045	56-87-1	HMDB00182	18019	5.61E-01	8.20E-01	5.85E-01
Taurochenodeoxycholic-acid / Taurodeoxycholic-acid	107 / 105	Positif	C26H45NO6S	500/304	112	516-35-8.516-50-7	HMDB00951 / HMDB00896	16525 / 941	5.61E-01	8.20E-01	7.71E-01
Methylhistamine	1100	Positif	C6H11N3	126/1026	677	501-75-7	HMDB00898	29009	5.61E-01	9.79E-01	4.31E-01
Hypoxanthine	986	Positif	C5H4N4O	137/0458	532	68-94-0	HMDB00157	17368	5.61E-01	9.79E-01	6.61E-01
Xanthine1	123	Positif	C5H4N4O2	153/0407	685	69-89-6	HMDB00292	17712	5.61E-01	9.79E-01	6.61E-01
O-Phosphorylethanolamine	735	Positif	C2H8NO4P	142/0264	948	1071-23-4	HMDB00224	17553	5.61E-01	9.79E-01	7.40E-01
L-Histidine-methyl-ester	1069	Positif	C7H11N3O2	170/0924	215	7389-87-9	NA	NA	5.61E-01	9.79E-01	8.03E-01
Tyrosine1	36	Positif	C9H11NO3	182/0812	709	60-18-4	HMDB00158	17895	5.61E-01	9.79E-01	8.31E-01
X3-Aminosalicilic-acid	675	Positif	C7H7NO3	154/0499	175	570-23-0	HMDB01972	89327	5.64E-01	8.66E-01	5.85E-01
X4-Imidazoleacrylic-acid / 5-Aminopyridine-3-carboxylic-acid / 6-Aminopyridine-3-carboxylic-acid	677 / 1071 / 1079	Positif	C6H6N2O2	139/0502	655	104-98-3.24242-19-1.3167-49-5	HMDB00301 / NA / NA	30817 / NA / NA	5.65E-01	8.20E-01	5.42E-01
D-allo-Threonine / L-Homoserine / Threonine	471 / 20 / 31	Positif	C4H9NO3	120/0655	797	24830-94-2.672-15-1.72-19-5	HMDB04041 / HMDB00719 / HMDB00167	28718 / 15699 / 16857	5.65E-01	9.79E-01	6.61E-01
Adenosine-diphosphate-ribose1	140	Négatif	C15H23N5O14P2	558/0644	924	20762-30-5	HMDB01178	16960	5.79E-01	6.94E-01	7.50E-01
D-Ala-D-Ala3	470	Négatif	C6H12N2O3	159/0775	748	923-16-0	HMDB03459	16576	5.79E-01	9.97E-01	6.26E-01
Aminobutyric-acid1	974	Négatif	C4H9NO2	102/056	737	1492-24-6	HMDB00452	35619	5.90E-01	7.16E-01	9.83E-01
Arginine	35	Positif	C6H14N4O2	175/119	1042	74-79-3	HMDB00517	16467	5.95E-01	9.92E-01	8.31E-01
Lysine1	23	Négatif	C6H14N2O2	145/0983	1005	56-87-1	HMDB00182	18019	5.98E-01	8.45E-01	9.71E-01
Allantoic-acid	425	Négatif	C4H8N4O4	175/0473	897	99-16-1	HMDB01209	30837	5.99E-01	6.94E-01	7.70E-01



D-Glucosamine-6-phosphate1	701	Négatif	C6H14NO8P	258/0384	946	3616-42-0	HMDB01254	15873	6.05E-01	6.94E-01	5.97E-01
X7-8-Dihydro-L-biopterin2	409	Négatif	C9H13N5O3	238/0946	737	6779-87-9	HMDB00038	64277	6.11E-01	7.52E-01	8.93E-01
Caproic-acid	44	Négatif	C6H12O2	115/0765	122	142-62-1	HMDB00535	30776	6.11E-01	7.73E-01	8.48E-01
L-Pyroglutamic-acid1	950	Négatif	C5H7NO3	128/0353	839	98-79-3	HMDB00267	18183	6.11E-01	8.98E-01	8.15E-01
Leucine / L-Norleucine1	34 / 1003	Négatif	C6H13NO2	130/0874	548	61-90-5-327-57-1	HMDB00687 / HMDB01645	15603 / 18347	6.12E-01	8.98E-01	7.70E-01
Cystathionine / L-Cystathionine1	127 / 259	Négatif	C7H14N2O4S	221/0602	944	535-34-2-56-88-2	HMDB00455 / HMD00099	NA / 17482	6.16E-01	6.94E-01	8.66E-01
Guanosine1	5	Négatif	C10H13N5O5	282/0844	691	118-00-3	HMDB00133	16750	6.24E-01	7.14E-01	4.21E-01
Azelaic-acid	295	Négatif	C9H16O4	187/0976	746	123-99-9	HMDB00784	48131	6.24E-01	6.94E-01	9.71E-01
X7-8-Dihydro-L-biopterin1	409	Négatif	C9H13N5O3	238/0946	666	6779-87-9	HMDB00038	64277	6.24E-01	7.14E-01	1.42E-01
X3-AMP1	176	Négatif	C10H14N5O7P	346/0558	814	84-21-9	HMDB003540	28931	6.25E-01	9.21E-01	6.48E-01
Citraconic-acid	451	Négatif	C5H6O4	129/0193	938	498-23-7	HMDB00634	17626	6.26E-01	8.45E-01	4.05E-01
Guanosine	5	Positif	C10H13N5O5	284/099	690	118-00-3	HMDB00133	16750	6.29E-01	8.80E-01	5.42E-01
Picolinic-acid1	231	Négatif	C6H5NO2	122/0247	461	98-98-6	HMDB02243	28747	6.29E-01	8.45E-01	9.71E-01
Guanine	1102	Positif	C5H5N5O	152/0567	689	73-40-5	HMDB00132	16235	6.37E-01	8.88E-01	5.85E-01
X11-12-Epoxy-5Z-8Z-14Z-eicosatrienoic-acid / 8S-Hydroxy-5Z-9E-11Z-14Z-eicosatetraenoic-acid	359 / 662	Négatif	C20H32O3	319/2279	87	81276-02-0-98462-03-4	HMD804673 / HMD804679	NA / 34486	6.46E-01	8.45E-01	9.83E-01
L-Threonine-acid1	552	Négatif	C4H8O5	135/0299	768	734111	HMDB00943	15908	6.47E-01	9.89E-01	6.03E-01
Ornithine	163	Positif	C5H12N2O2	133/0972	971	70-26-8	HMDB00214	15729	6.50E-01	9.79E-01	5.42E-01
Muramic-acid2	565	Négatif	C9H17NO7	250/0932	861	1114-41-6	HMDB03254	28118	6.55E-01	7.52E-01	6.19E-01
X4-Pyridoxic-acid2	678	Positif	C8H9NO4	184/0604	113	82-82-6	HMDB00017	17405	6.59E-01	9.79E-01	5.42E-01
Glutaconic-acid / Itaconic-acid / Mesaconic-acid	516 / 540 / 562	Négatif	C5H6O4	129/0193	932	1724-02-3-97-65-4-498-24-8	HMDB00620 / HMD802092 / HMD800749	15670 / 30838 / 16600	6.62E-01	8.45E-01	3.83E-01
Elaidic-acid / trans-Vaccenic-acid	498 / 64	Négatif	C18H34O2	281/2486	84	112-79-8-693-72-1	HMDB00573 / HMD803231	27997 / 50464	6.66E-01	8.45E-01	1.42E-01
D-Ala-D-Ala	470	Positif	C6H12N2O3	161/0921	746	923-16-0	HMDB03459	16576	6.69E-01	9.79E-01	5.85E-01
Glycerol-3-phosphate	1086	Positif	C3H9O6P	173/021	923	57-03-4	HMDB00126	15978	6.69E-01	9.92E-01	7.44E-01
D-Penicillamine / Methionine	1065 / 28	Positif	C5H11NO2S	150/0583	671	52-67-5-63-68-3	HMD814997 / HMD800696	50868 / 16643	6.70E-01	8.20E-01	6.54E-01
Aspartylglycosamine	578	Négatif	C12H21N3O8	334/1256	931	2776-93-4	HMDB00489	17261	6.79E-01	8.97E-01	7.40E-01
Citric-acid / Isocitric-acid1	14 / 46	Négatif	C6H8O7	191/0197	998	77-92-9-320-77-4	HMDB00094 / HMD800193	30769 / 30887	6.81E-01	6.94E-01	6.19E-01
X2-2-Dimethylsuccinic-acid / 2-Methylglutaric-acid / 3-Methylglutaric-acid / Adipic-acid	894 / 965 / 987 / 17	Négatif	C6H10O4	145/0506	890	597-43-3-617-62-9-626-51-7-124-04-9	HMD802074 / HMD800422 / HMD800752 / HMD800448	86537 / 68567 / 68566 / 30832	6.86E-01	8.75E-01	8.30E-01
N-Acetyl-D-allo-isoleucine / N-Acetyl-L-leucine	948 / 316	Négatif	C8H15NO3	172/0979	211	54831-20-8-1188-21-2	HMD861684 / HMD811756	NA / 17786	6.86E-01	8.12E-01	8.99E-01
X2-Aminoisobutyric-acid	671	Négatif	C4H9NO2	102/056	720	62-57-7	HMDB01906	27971	7.01E-01	6.94E-01	9.90E-01
Triethanolamine	817	Positif	C6H15NO3	150/1125	214	102-71-6	HMD832538	28621	7.04E-01	8.20E-01	9.72E-01
Prostaglandin-A2	606	Positif	C20H30O4	335/2217	111	13345-50-1	HMDB02752	27820	7.04E-01	8.66E-01	5.85E-01
Asparagine / Gly-Gly	33 / 1089	Positif	C4H8N2O3	133/0608	887	70-47-3-556-50-3	HMD800168 / HMD811733	17196 / 17201	7.04E-01	9.79E-01	5.85E-01
X1-Methylhistidine	41	Positif	C7H11N3O2	170/0924	679	332-80-9	HMDB00001	50599	7.16E-01	9.10E-01	6.77E-01
Prostaglandin-B2	608	Positif	C20H30O4	335/2217	110	13367-85-6	HMD804236	28099	7.22E-01	8.66E-01	5.85E-01
N-acetyl-DL-glutamic-acid / N-Acetyl-L-glutamic-acid	898 / 576	Positif	C7H11NO5	190/071	893	1188-37-0-1188-37-0	HMD801138 / HMD801138	12575 / 12575	7.24E-01	9.92E-01	9.02E-01
X2-Hydroxycinnamic-acid / p-Coumaric-acid	207 / 301	Négatif	C9H8O3	163/0401	484	583-17-5-4501-31-9	HMD802641 / HMD830677	18125 / 1745	7.24E-01	8.75E-01	6.19E-01
L-Glutamic-acid3	222	Positif	C5H9NO4	148/0605	979	56-86-0	HMD800148	16015	7.42E-01	8.20E-01	5.42E-01
Asparagine / Gly-Gly3	33 / 1089	Positif	C4H8N2O3	133/0608	839	70-47-3-556-50-3	HMD800168 / HMD811733	17196 / 17201	7.42E-01	9.79E-01	8.86E-01
X3-Hydroxy-3-methylglutaric-acid2	676	Négatif	C6H10O5	161/0455	927	503-49-1	HMD800355	16831	7.47E-01	6.94E-01	1.81E-01
Taurochenodeoxycholic-acid / Taurodeoxycholic-acid1	107 / 105	Négatif	C26H45NO6S	498/2895	114	516-35-8-516-50-7	HMD800951 / HMD800896	16525 / 941	7.47E-01	6.94E-01	6.19E-01
N-Acetylglycine2	308	Négatif	C4H7NO3	116/0353	596	543-24-8	HMD800532	40410	7.47E-01	7.75E-01	6.03E-01
Leucine / L-Norleucine	34 / 1003	Positif	C6H13NO2	132/1019	549	61-90-5-327-57-1	HMD800687 / HMD801645	15603 / 18347	7.48E-01	9.79E-01	7.08E-01
N-acetyl-L-glutamine1	890	Négatif	C7H12N2O4	187/0724	670	2490-97-3	HMD806029	73685	7.56E-01	8.45E-01	8.69E-01
N-acetyl-DL-glutamic-acid / N-Acetyl-L-glutamic-acid1	898 / 576	Négatif	C7H11NO5	188/0564	893	1188-37-0-1188-37-0	HMD801138 / HMD801138	12575 / 12575	7.56E-01	9.21E-01	9.23E-01
Pantothenic-acid1	58	Négatif	C9H17NO5	218/1034	526	79-83-4	HMD800210	7916	7.62E-01	6.94E-01	5.07E-01
D-Ala-D-Ala2	470	Négatif	C6H12N2O3	159/0775	700	923-16-0	HMD803459	16576	7.64E-01	6.94E-01	8.15E-01
Pro-Leu	1060	Positif	C11H20N2O3	229/1547	529	52899-07-7	NA	NA	7.65E-01	8.20E-01	5.42E-01
N-acetyl-L-glutamine	890	Positif	C7H12N2O4	189/087	668	2490-97-3	HMD806029	73685	7.65E-01	8.20E-01	8.31E-01
Sarcosine	168	Positif	C3H7NO2	90/055	798	107-97-1	HMD800271	15611	7.65E-01	9.78E-01	6.20E-01
Proline	21	Positif	C5H9NO2	116/0706	703	147-85-3	HMD800162	17203	7.65E-01	9.79E-01	8.31E-01
X1-methyl-guanine / 7-methylguanin1	121 / 7	Négatif	C6H7N5O	164/0578	442	938-85-2-578-76-7	HMD803282 / HMD800897	21803 / 28664	7.66E-01	7.14E-01	7.65E-01
Hexadecanedioic-acid1	264	Négatif	C16H30O4	285/2071	101	505-54-4	HMD800672	73722	7.70E-01	8.98E-01	6.88E-01
N-Acetyl-L-asparagine1	887	Négatif	C6H10N2O4	173/0568	707	4033-40-3	HMD806028	NA	7.79E-01	6.94E-01	6.19E-01
DL-Tryptophan / L-Tryptophan1	289 / 292	Négatif	C11H12N2O2	203/0826	599	54-12-6-73-22-3	HMD803396 / HMD800929	27897 / 16828	8.14E-01	8.86E-01	6.26E-01
DL-p-Hydroxyphenyllactic-acid / Homovanillic-acid	899 / 187	Négatif	C9H10O4	181/0506	489	306-23-0-306-08-1	HMD800755 / HMD800118	17385 / 54596	8.15E-01	8.75E-01	5.88E-01
cis-Aconitic-acid / trans-Aconitic-acid	450 / 305	Négatif	C6H6O6	173/0092	1057	585-84-2-4023-65-8	HMD800072 / HMD800958	32805 / 32806	8.15E-01	8.86E-01	9.86E-01
D-Pyroglutamic-acid	352	Positif	C5H7NO3	130/0499	668	4042-36-8	HMD800805	16010	8.19E-01	8.20E-01	8.76E-01
Cytosine	142	Positif	C4H5N3O	112/0505	515	71-30-7	HMD800630	16040	8.19E-01	9.79E-01	5.85E-01
Serine	37	Positif	C3H7NO3	106/0499	880	56-45-1	HMD800187	17115	8.19E-01	9.79E-01	5.85E-01
Betaine / Valine	439 / 3	Positif	C5H11NO2	118/0863	661	107-43-7-72-18-4	HMD800883	17750 / 16414	8.19E-01	9.87E-01	6.20E-01
Creatinine	997	Positif	C4H7N3O	114/0662	392	60-27-5	HMD800562	16737	8.27E-01	8.25E-01	9.71E-01
X2-Aminobenzoic-acid / Trigonelline2	132 / 748	Positif	C7H7NO2	138/055	638	118-92-3-535-83-1	HMD801123 / HMD800875	30754 / 18123	8.27E-01	9.79E-01	5.85E-01
D-Fructose-1-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Glucose-6-PO4 / Mannose-1-phosphate	477 / 490 / 1186 / 281 / 65 / 416	Positif	C6H13O9P	261/037	1015	15978-08-2-3672-15-9-2255-14-3-59-56-3-56-73-5-27251-84-9	HMD801076 / HMD801078 / HMD800645 / HMD801586 / HMD801401 / HMD806330	704854 / 49728 / 17973 / 16077 / 4170 / 35374	8.27E-01	9.79E-01	7.01E-01
Nicotinamide1	581	Négatif	C6H6N2O	121/0407	163	98-92-0	HMD801406	17154	8.34E-01	7.52E-01	3.15E-01
Proline1	21	Négatif	C5H9NO2	114/0561	703	147-85-3	HMD800162	17203	8.34E-01	8.35E-01	7.65E-01
DL-Leucine / Isoleucine / Leucine / L-Norleucine1	216 / 25 / 34 / 1003	Négatif	C6H13NO2	130/0874	578	5699-54-7-73-32-5-61-90-5-327-57-1	HMD803640 / HMD800172 / HMD800687 / HMD801645	15604 / 17191 / 15603 / 18347	8.34E-01	8.45E-01	6.19E-01

Citric-acid / Isocitric-acid	14 / 46	Négatif	C6H8O7	191/0197	1057	77-92-9.320-77-4	HMDB00094 / HMDB00193	30769 / 30887	8.34E-01	8.98E-01	9.83E-01
X2-Aminobenzoic-acid / Trigonelline1	132 / 748	Positif	C7H7NO2	138/055	613	118-92-3.535-83-1	HMDB01123 / HMDB00875	30754 / 18123	8.52E-01	8.20E-01	5.85E-01
Butyryl-carnitine	1134	Positif	C11H21NO4	232/1543	441	25576-40-3	HMDB02013	7676	8.71E-01	9.79E-01	9.82E-01
X5-Aminopyridine-3-carboxylic-acid / 6-Aminopyridine-3-carboxylic-acid1	1071 / 1079	Négatif	C6H6N2O2	137/0357	625	.24242-19-1.3167-49-5	NA / NA	NA / NA	8.85E-01	8.86E-01	6.03E-01
Tyrosine	36	Positif	C9H11NO3	182/0812	777	60-18-4	HMDB00158	17895	8.90E-01	8.20E-01	5.85E-01
L-Aspartic-acid	266	Positif	C4H7NO4	134/0448	916	56-84-8	HMDB00191	17053	8.90E-01	8.20E-01	6.20E-01
UDP-N-acetylglucosamine	1164	Positif	C17H27N3O17P2	608/0889	970	528-04-1	HMDB00290	16264	8.90E-01	8.20E-01	6.20E-01
Methylhistamine1	1100	Positif	C6H11N3	126/1026	638	501-75-7	HMDB00898	29009	8.90E-01	8.20E-01	7.25E-01
KMBA	304	Positif	C5H8O3S	149/0267	782	NA	NA	NA	8.90E-01	9.79E-01	6.20E-01
Arginine2	35	Positif	C6H14N4O2	175/119	1023	74-79-3	HMDB00517	16467	8.90E-01	9.92E-01	9.66E-01
D-Glutamine / L-Glutamine1	247 / 24	Négatif	C5H10N2O3	145/0619	839	5959-95-5.56-85-9	HMDB03423 / HMDB00641	17061 / 1805	8.91E-01	9.88E-01	8.15E-01
Ribonic-acid-gamma-lactone	468	Négatif	C5H8O5	147/0299	761	1255190	HMDB01900	NA	8.94E-01	6.94E-01	4.86E-01
D-Fructose-1-phosphate / D-Fructose-6-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Mannose-1-phosphate	477 / 700 / 490 / 1186 / 281 / 416	Négatif	C6H13O9P	259/0224	926	15978-08-2.643-13-0.3672-15-9.2255-14-3.59-56-3.27251-84-9	HMDB01076 / HMDB00124 / HMDB01078 / HMDB00645 / HMDB01586 / HMDB06330	704854 / 15946 / 49728 / 17973 / 16077 / 35374	8.94E-01	9.89E-01	2.56E-02
Imidazolelactic-acid2	283	Négatif	C6H8N2O3..	155/0462	707	876-19-7	HMDB02320	27487	8.98E-01	7.14E-01	6.19E-01
UDP3	171	Positif	C9H14N2O12P2	405/0095	971	58-98-0	HMDB00295	17659	8.98E-01	8.20E-01	5.85E-01
Lysine2	23	Positif	C6H14N2O2	147/1128	1005	56-87-1	HMDB00182	18019	8.98E-01	9.31E-01	6.29E-01
Deoxycholic-acid1	48	Négatif	C24H40O4	391/2854	123	83-44-3	HMDB00626	28834	9.02E-01	7.75E-01	6.19E-01
Ursodeoxycholic-acid1	235	Négatif	C24H40O4.	391/2854	123	128-13-2	HMDB00946	9907	9.02E-01	7.75E-01	6.19E-01
L-Pyrroglutamic-acid3	950	Négatif	C5H7NO3	128/0353	918	98-79-3	HMDB00267	18183	9.02E-01	8.98E-01	6.19E-01
X3-Hydroxybutyric-acid2	356	Négatif	C4H8O3	103/0401	562	6168-83-8	HMDB00442	17290	9.02E-01	9.12E-01	6.03E-01
D-Ala-D-Ala1	470	Négatif	C6H12N2O3	159/0775	658	923-16-0	HMDB03459	16576	9.03E-01	6.94E-01	6.48E-01
X2-Hydroxybenzyl-alcohol / 3-Hydroxybenzyl-alcohol / 4-Hydroxybenzyl-alcohol	995 / 1020 / 984	Négatif	C7H8O2	123/0452	163	90-01-7.620-24-6.623-05-2	HMDB59709 / HMDB59712 / HMDB11724	16464 / 17069 / 437856	9.03E-01	7.50E-01	3.94E-01
L-Aspartic-acid1	266	Négatif	C4H7NO4	132/0302	916	56-84-8	HMDB00191	17053	9.03E-01	7.75E-01	8.03E-01
Alpha-D-Aminoadipic-acid	113	Négatif	C6H11NO4	160/0615	982	542-32-5	HMDB00510	37024	9.03E-01	8.45E-01	4.08E-01
cis-4-hydroxy-D-proline / trans-4-hydroxy-L-proline	96 / 889	Négatif	C5H9NO3	130/051	913	2584-71-6.51-35-4	HMDB06460 / HMDB00725	16231 / 18095	9.03E-01	8.98E-01	7.00E-01
L-Pyrroglutamic-acid2	950	Négatif	C5H7NO3	128/0353	893	98-79-3	HMDB00267	18183	9.03E-01	9.44E-01	8.99E-01
Glycerol-3-phosphate2	1086	Négatif	C3H9O6P	171/0064	923	57-03-4	HMDB00126	15978	9.03E-01	9.98E-01	8.30E-01
Ornithine1	163	Négatif	C5H12N2O2	131/0826	970	70-26-8	HMDB00214	15729	9.19E-01	8.45E-01	9.83E-01
X2-hydroxycaproic-acid2	194	Négatif	C6H12O3	131/0713	161	6064-63-7	HMDB01624	86542	9.19E-01	9.21E-01	6.92E-01
Tartaric-acid	542	Négatif	C4H6O6	149/0092	1005	87-69-4	HMDB00956	15671	9.23E-01	7.52E-01	9.21E-01
Aspartylglycosamine1	578	Négatif	C12H21N3O8	334/1256	901	2776-93-4	HMDB00489	17261	9.24E-01	8.45E-01	6.88E-01
N-acetyl-DL-norvaline / N-Isovalerylglycine	1096 / 1111	Négatif	C7H13NO3	158/0823	220	50-282-947.16284-60-9	NA / HMDB00678	NA / NA	9.24E-01	8.45E-01	6.88E-01
Betaine / Valine2	439 / 3	Négatif	C5H11NO2	116/0717	661	107-43-7.72-18-4	HMDB00043 / HMDB00883	17750 / 16414	9.24E-01	8.75E-01	6.19E-01
Methionine-sulfoxide	298	Positif	C5H11O3NS	166/0533	782	62697-73-8	HMDB02005	49033	9.30E-01	9.79E-01	5.85E-01
Pipecolinic-acid	272	Positif	C6H11NO2	130/0863	667	535-75-1	HMDB00070	17964	9.31E-01	8.20E-01	7.31E-01
X4-Amino-nicotinic-acid2	1073	Positif	C6H6N2O2	139/0502	533	7418-65-7	NA	NA	9.31E-01	9.79E-01	5.85E-01
L-Glutamic-acid2	222	Négatif	C5H9NO4	146/0459	917	56-86-0	HMDB00148	16015	9.33E-01	8.75E-01	6.19E-01
Nonanoic-acid	586	Négatif	C9H18O2	157/1234	104	112-05-0	HMDB00847	29019	9.34E-01	7.84E-01	6.03E-01
Aminobutyric-acid	88	Négatif	C4H9NO2	102/0561	918	56-12-2	HMDB00112	16865	9.34E-01	8.75E-01	6.19E-01
L-Glutamic-acid	222	Positif	C5H9NO4	148/0605	917	56-86-0	HMDB00148	16015	9.39E-01	9.79E-01	5.85E-01
Pantothenic-acid	58	Positif	C9H17NO5	220/118	526	79-83-4	HMDB00210	7916	9.39E-01	8.20E-01	5.85E-01
UDP-N-acetylglucosamine1	1164	Négatif	C17H27N3O17P2	606/0743	972	528-04-1	HMDB00290	16264	9.41E-01	6.94E-01	8.30E-01
D-Saccharic-acid	1142	Négatif	C6H10O8	209/0303	1021	25525-21-7	HMDB00663	16002	9.42E-01	6.94E-01	1.42E-01
D-Lactic-acid / Glyceraldehyde	243 / 287	Négatif	C3H6O3	89/0244	523	10326-41-7.56-82-6	HMDB01311 / HMDB01051	341 / 5445	9.42E-01	8.86E-01	4.05E-01
a-Ketoglutaric-acid	422	Négatif	C5H6O5	145/0142	940	328-50-7	HMDB00208	30915	9.53E-01	8.98E-01	6.19E-01
Alanine / Alanine2	29 / 339	Négatif	C3H7NO2	88/0404	917	56-41-7.107-95-9	HMDB00161 / HMDB00056	16977 / 16958	9.58E-01	8.45E-01	8.30E-01
L-Pyrroglutamic-acid	950	Positif	C5H7NO3	130/0499	917	98-79-3	HMDB00267	18183	9.64E-01	9.79E-01	5.85E-01
Deoxycytidine1	145	Négatif	C9H13N3O4	226/0833	597	951-77-9	HMDB00014	15698	9.75E-01	8.45E-01	8.20E-01
N-Acetyl-L-asparagine	887	Positif	C6H10N2O4	175/0713	712	4033-40-3	HMDB06028	NA	9.87E-01	8.20E-01	9.02E-01



Tableau II. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles réalisées dans l'hypothalamus

Métabolite	Identifiant CEA	Mode d'acquisition	Formule brute	Masse (m/z)	Temps de rétention (minutes)	Identifiant CAS	Identifiant HMDB	Identifiant ChEBI	FDR Régime post-sevrage	FDR Groupe maternel	FDR Interaction
X1-5-Anhydro-D-sorbitol	357	Négatif	C6H12O5	163/0612	10.16	154-58-5	HMDB02712	16070	1.30E-09	9.02E-01	9.59E-01
Pantothenic-acid	58	Négatif	C9H17NO5	218/1034	8.74	79-83-4	HMDB00210	7916	1.20E-04	9.82E-01	9.59E-01
Pantothenic-acid	58	Positif	C9H17NO5	220/118	8.73	79-83-4	HMDB00210	7916	2.08E-04	9.59E-01	9.99E-01
X3-Hydroxybutyric-acid	356	Négatif	C4H8O3	103/0401	8.57	6168-83-8	HMDB00442	17290	6.74E-04	9.82E-01	9.59E-01
X3-Aminosalicylic-acid	675	Positif	C7H7NO3	154/0499	2.98	570-23-0	HMDB01972	89327	3.70E-03	9.52E-01	9.99E-01
Argininosuccinic-acid	687	Négatif	C10H18N4O6	289/1154	16.45	2387-71-5	HMDB00052	15682	7.45E-03	9.02E-01	9.59E-01
Phenylalanine	27	Négatif	C9H11NO2	164/0717	8.16	63-91-2	HMDB00159	17295	1.43E-02	9.02E-01	9.59E-01
Asparagine / Gly-Gly	33 / 1089	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	13.98	70-47-3 / 556-50-3	HMDB00168 / HMDB11733	17196 / 17201	2.02E-02	9.82E-01	9.59E-01
Tartaric-acid	542	Négatif	C4H6O6	149/0092	16.72	87-69-4	HMDB00956	15671	2.02E-02	5.12E-01	9.59E-01
Phenylalanine	27	Positif	C9H11NO2	166/0863	8.17	63-91-2	HMDB00159	17295	2.25E-02	8.37E-01	9.99E-01
Arginine	35	Négatif	C6H14N4O2	173/1044	17.15	74-79-3	HMDB00517	16467	3.33E-02	9.02E-01	9.59E-01
Betaine / Valine	439 / 3	Négatif	C5H11NO2	116/0717	11.02	107-43-7 / 72-18-4	HMDB00043 / HMDB00883	17750 / 16414	3.33E-02	9.02E-01	9.59E-01
DL-Tryptophan	289	Négatif	C11H12N2O2	203/0826	9.98	54-12-6	HMDB03396	27897	3.33E-02	7.69E-01	9.59E-01
L-Saccharopine	810	Négatif	C11H20N2O6	275/1249	16.02	997-68-2	HMDB00279	16927	3.33E-02	9.82E-01	9.99E-01
Leu-Pro	1061	Négatif	C11H20N2O3	227/1401	3.59	87178-63-0	HMDB11175	NA	3.57E-02	5.12E-01	9.59E-01
DL-Tryptophan	289	Positif	C11H12N2O2	205/0972	9.99	54-12-6	HMDB03396	27897	3.84E-02	8.34E-01	9.99E-01
Gly-Pro / Pro-Gly1	1109 / 1016	Négatif	C7H12N2O3	171/0775	13.48	704-15-4 / 2578-57-6	HMDB00721 / HMDB11178	356660 / NA	4.79E-02	9.82E-01	9.59E-01
X1-Methylhistidine / 3-Methylhistidine / Methyl-DL-histidine	41 / 1013 / 1072	Négatif	C7H11N3O2	168/0778	12.3	332-80-9 / 368-16-1 / NA	HMDB00001 / HMDB00479 / NA	50599 / 27596 / NA	4.79E-02	7.86E-01	9.59E-01
X3-Amino-3-4-hydroxyphenylpropanoic-acid / Tyrosine	1126 / 36	Négatif	C9H11NO3	180/0666	11.81	/ 6049-54-3 / 60-18-4	NA / HMDB00158	16939 / 17895	4.79E-02	7.86E-01	9.69E-01
Ornithine	163	Négatif	C5H12N2O2	131/0826	17.15	70-26-8	HMDB00214	15729	5.11E-02	9.80E-01	9.59E-01
D-Mannitol / Dulcitol	978 / 1187	Négatif	C6H14O6	181/0718	12.83	69-65-8 / 608-66-2	HMDB00765 / HMDB00107	16899 / 16813	5.42E-02	7.86E-01	9.59E-01
D-allo-Threonine / L-Homoserine / Threonine	471 / 20 / 31	Négatif	C4H9NO3	118/051	13.3	24830-94-2 / 672-15-1 / 72-19-5	HMDB04041 / HMDB00719 / HMDB00167	28718 / 15699 / 16857	6.72E-02	9.02E-01	9.59E-01
Gluconic-acid	831	Négatif	C6H12O7	195/051	13.61	526-95-4	HMDB00625	33198	6.72E-02	9.82E-01	9.59E-01
X5-Methoxyindoleacetate	212	Négatif	C11H11NO3	204/0666	6.12	608-07-1	HMDB04095	235589	7.11E-02	7.86E-01	9.59E-01
DL-Leucine / Isoleucine / Leucine / L-Norleucine1	216 / 25 / 34 / 1003	Négatif	C6H13NO2	130/0874	9.63	5699-54-7 / 73-32-5 / 61-90-5 / 327-57-1	HMDB03640 / HMDB00172 / HMDB00687 / HMDB01645	15604 / 17191 / 15603 / 18347	8.40E-02	9.02E-01	9.59E-01
Argininosuccinic-acid	687	Positif	C10H18N4O6	291/1299	16.44	2387-71-5	HMDB00052	15682	9.15E-02	9.59E-01	9.99E-01
Betaine / Valine	439 / 3	Positif	C5H11NO2	118/0863	11.03	107-43-7 / 72-18-4	HMDB00043 / HMDB00883	17750 / 16414	9.15E-02	9.59E-01	9.99E-01
Tyrosine	36	Positif	C9H11NO3	182/0812	11.8	60-18-4	HMDB00158	17895	9.15E-02	8.37E-01	9.99E-01
L-Saccharopine	810	Positif	C11H20N2O6	277/1394	16.01	997-68-2	HMDB00279	16927	1.04E-01	9.70E-01	9.99E-01
DL-p-Hydroxyphenyllactic-acid / Homovanillic-acid	899 / 187	Négatif	C9H10O4	181/0506	8.06	306-23-0 / 306-08-1	HMDB00755 / HMDB00118	17385 / 54596	1.04E-01	7.69E-01	9.69E-01
Leucine / L-Norleucine1	34 / 1003	Négatif	C6H13NO2	130/0874	9.13	61-90-5 / 327-57-1	HMDB00687 / HMDB01645	15603 / 18347	1.16E-01	9.82E-01	9.59E-01
Alpha-D-Aminoadiopic-acid	113	Positif	C6H11NO4	162/0761	15.37	542-32-5	HMDB00510	37024	1.21E-01	8.37E-01	9.99E-01
Gly-Pro / Pro-Gly	1109 / 1016	Positif	C7H12N2O3	173/0921	13.37	704-15-4 / 2578-57-6	HMDB00721 / HMDB11178	356660 / NA	1.21E-01	9.59E-01	9.99E-01
X4-Guanidinobutyric-acid	276	Positif	C5H11N3O2	146/0924	13.97	463-00-3	HMDB03464	15728	1.21E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Lactic-acid / Glyceraldehyde	243 / 287	Négatif	C3H6O3	89/0244	8.66	10326-41-7 / 56-82-6	HMDB01311 / HMDB01051	341 / 5445	1.25E-01	9.02E-01	9.59E-01
Leucine / L-Norleucine	34 / 1003	Positif	C6H13NO2	132/1019	9.16	61-90-5 / 327-57-1	HMDB00687 / HMDB01645	15603 / 18347	1.39E-01	9.59E-01	9.99E-01
Alpha-D-Aminoadiopic-acid1	113	Négatif	C6H11NO4	160/0615	15.38	542-32-5	HMDB00510	37024	1.50E-01	8.67E-01	9.59E-01
DL-Leucine / Isoleucine / Leucine / L-Norleucine	216 / 25 / 34 / 1003	Positif	C6H13NO2	132/1019	9.6	5699-54-7 / 73-32-5 / 61-90-5 / 327-57-1	HMDB03640 / HMDB00172 / HMDB00687 / HMDB01645	15604 / 17191 / 15603 / 18347	1.51E-01	9.59E-01	9.99E-01
Prostaglandin-A1 / Prostaglandin-B1	605 / 607	Positif	C20H32O4	337/2373	2	14152-28-4 / 13345-51-2	HMDB02656 / HMDB02982	15545 / 27624	1.51E-01	9.59E-01	9.99E-01
L-Citrulline	91	Négatif	C6H13N3O3	174/0884	14.56	372-75-8	HMDB00904	16349	1.55E-01	9.87E-01	9.59E-01
X1-Methylhistidine / 3-Methylhistidine / Methyl-DL-histidine	41 / 1013 / 1072	Positif	C7H11N3O2	170/0924	12.21	332-80-9 / 368-16-1 / NA	HMDB00001 / HMDB00479 / NA	50599 / 27596 / NA	1.60E-01	8.37E-01	9.99E-01
p-Coumaric-acid	301	Négatif	C9H8O3	163/0401	8.14	4501-31-9	HMDB30677	17450	1.63E-01	7.86E-01	9.69E-01
Asparagine / Gly-Gly	33 / 1089	Positif	C4H8N2O3	133/0608	13.99	70-47-3 / 556-50-3	HMDB00168 / HMDB11733	17196 / 17201	1.79E-01	8.37E-01	9.99E-01
N-Acetylneuraminic-acid1	801	Négatif	C11H19NO9	308/0987	13.9	131-48-6	HMDB00230	45744	1.91E-01	9.17E-01	9.69E-01
D-allo-Threonine / L-Homoserine / Threonine	471 / 20 / 31	Positif	C4H9NO3	120/0655	13.29	24830-94-2 / 672-15-1 / 72-19-5	HMDB04041 / HMDB00719 / HMDB00167	28718 / 15699 / 16857	2.04E-01	9.59E-01	9.99E-01
Creutinine	997	Positif	C4H7N3O	114/0662	6.56	60-27-5	HMDB00562	16737	2.12E-01	9.52E-01	9.99E-01
Indolelactic-acid	221	Négatif	C11H11NO3	204/0666	5.88	1821-52-9	HMDB00671	24813	2.14E-01	7.69E-01	9.59E-01
Histidine1	22	Négatif	C6H9N3O2	154/0622	13.42	71-00-1	HMDB00177	15971	2.16E-01	9.82E-01	9.59E-01
Inosine-5-monophosphate	530	Positif	C10H13N4O8P	349/0544	16.52	131-99-7	HMDB00175	17202	2.18E-01	8.37E-01	9.99E-01
L-Anserine	544	Positif	C10H16N4O3	241/1295	13.09	584-85-0	HMDB00194	18323	2.18E-01	9.59E-01	9.99E-01
Proline1	21	Négatif	C5H9NO2	114/0561	11.71	147-85-3	HMDB00162	17203	2.46E-01	9.82E-01	9.59E-01
Inosine-5-monophosphate1	530	Négatif	C10H13N4O8P	347/0398	16.51	131-99-7	HMDB00175	17202	2.47E-01	8.86E-01	9.69E-01
UMP	172	Négatif	C9H13N2O9P	323/0286	15.94	58-97-9	HMDB00288	16695	2.49E-01	9.02E-01	9.69E-01
Creutinine1	997	Négatif	C4H7N3O	112/0516	6.59	60-27-5	HMDB00562	16737	2.61E-01	9.02E-01	9.59E-01
Guanine1	1102	Négatif	C5H5N5O	150/0421	11.51	73-40-5	HMDB00132	16235	2.62E-01	9.82E-01	9.59E-01
X2-O-Methylguanosine	1120	Positif	C11H15N5O5	298/1146	8.03	2140-77-4	HMDB05862	19702	2.76E-01	9.52E-01	9.99E-01
beta-Pseudouridine	1138	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	10.96	1445-07-4	HMDB00767	17802	2.80E-01	9.02E-01	9.59E-01
cis-Aconitic-acid / trans-Aconitic-acid	450 / 305	Négatif	C6H6O6	173/0092	17.61	585-84-2 / 4023-65-8	HMDB00072 / HMDB00958	32805 / 32806	2.80E-01	9.87E-01	9.59E-01
Guanosine1	5	Négatif	C10H13N5O4	282/0844	11.51	118-00-3	HMDB00133	16750	2.80E-01	9.82E-01	9.59E-01
Histidine	22	Positif	C6H9N3O2	156/0768	13.31	71-00-1	HMDB00177	15971	3.29E-01	9.59E-01	9.99E-01
N-Acetyl-L-alanine	574	Négatif	C5H9NO3	130/051	8.63	97-69-8	HMDB00766	40992	3.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
Cytosine	142	Positif	C4H5N3O	112/0505	8.62	71-30-7	HMDB00630	16040	3.34E-01	8.37E-01	9.99E-01
Indoxyl-sulfate	1149	Négatif	C8H7NO4S	212/0023	3.25	487-94-5	HMDB00682	43355	3.42E-01	9.82E-01	9.59E-01
Adenosine	6	Positif	C10H13N5O4	268/104	6.03	58-61-7	HMDB00050	16335	3.61E-01	8.37E-01	9.99E-01
D-Myo-inositol-1-4-bisphosphate / Fructose-1-6-bisphosphate / D-Glucose-1-6-bisphosphate / 1	493 / 246 / 420	Négatif	C6H14O12P2	338/9888	17.59	47055-78-7 / 488-69-7 / 10139-18-1	HMDB00968 / HMDB01058 / HMDB03514	NA / 16905 / 18148	3.77E-01	9.02E-01	9.59E-01
X3-isopropylmalic-acid	1049	Négatif	C7H12O5	175/0612	14.35	921-28-8	HMDB12156	35114	3.77E-01	9.02E-01	9.59E-01
Adenosine1	6	Négatif	C10H13N5O4	266/0895	5.98	58-61-7	HMDB00050	16335	3.95E-01	9.02E-01	9.69E-01
Cytidine1	10	Négatif	C9H13N3O5	242/0783	10.2	65-46-3	HMDB00089	17562	3.95E-01	8.93E-01	9.59E-01
D-Ala-D-Ala1	470	Négatif	C6H12N2O3	159/0775	12.52	923-16-0	HMDB03459	16576	3.95E-01	9.59E-01	9.59E-01
D-Glutamine / L-Glutamine1	247 / 24	Négatif	C5H10N2O3	145/0619	13.98	5959-95-5 / 56-85-9	HMDB03423 / HMDB00641	17061 / 1805	3.95E-01	6.31E-01	9.59E-01

DL-3-Aminoisobutyric-acid / Aminoisobutyric-acid	487 / 88	Négatif	C4H9NO2	102/056	14.46	144-90-1 / 56-12-2	HMDB03911 / HMDB00112	27389 / 16865	3.95E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Xylose	109	Négatif	C5H10O5	149/0456	13.03	58-86-6	HMDB00098	53455	3.95E-01	7.69E-01	9.59E-01
X2-Hydroxy-2-methylbutyric-acid / 2-Hydroxy-3-methylbutyric-acid / 3-Hydroxy-3-methylbutyric-acid	967 / 903 / 976	Négatif	C5H10O3	117/0557	3.76	3739-30-8 / 4026-18-0 / 625-08-1	HMDB01987 / HMDB00407 / HMDB00754	68454 / 60645 / 37084	4.10E-01	9.82E-01	9.59E-01
X3-AMP / 5-AMP	176 / 972	Négatif	C10H14N5O7P	346/0558	14.5	84-21-9 / 61-19-8	HMDB03540 / HMDB00045	28931 / 16027	4.10E-01	9.82E-01	9.69E-01
Xanthosine	275	Négatif	C10H12N4O6	283/0684	12.1	146-80-5	HMDB00299	18107	4.36E-01	9.02E-01	9.59E-01
N-Acetyl-L-methionine1	904	Négatif	C7H13NO3S	190/0543	4.26	65-82-7	HMDB11745	21557	4.47E-01	5.88E-01	9.59E-01
X1-Methyladenosine	237	Positif	C11H15N5O4	282/1197	8.26	15763-06-1	HMDB03331	16020	4.52E-01	9.59E-01	9.99E-01
L-Serine1	544	Négatif	C10H16N4O3	239/115	13.1	584-85-0	HMDB00194	18323	4.56E-01	9.82E-01	9.59E-01
Biotin	62	Positif	C10H16N2O3S	245/0955	10.21	58-85-5	HMDB00030	15956	4.63E-01	8.37E-01	9.99E-01
GMP	185	Positif	C10H14N5O8P	364/0653	16.83	85-32-5	HMDB01397	17345	4.63E-01	8.37E-01	9.99E-01
X1-methyl-guanine / 7-methylguanine	121 / 7	Positif	C6H7N5O	166/0723	7.36	938-85-2 / 578-76-7	HMDB03282 / HMDB00897	21803 / 28664	4.71E-01	9.59E-01	9.99E-01
Carnitine	92	Positif	C7H15NO3	162/1125	12.57	541-15-1	HMDB00062	11060	4.83E-01	9.59E-01	9.99E-01
X4-Amino-nicotinic-acid	1073	Positif	C6H6N2O2	139/0502	8.79	7418-65-7	NA	NA	4.83E-01	9.52E-01	9.99E-01
L-Proglutamic-acid1	950	Négatif	C5H7NO3	128/0353	14	98-79-3	HMDB00267	18183	4.85E-01	7.69E-01	9.59E-01
Carnitine1	92	Négatif	C7H15NO3	160/0979	12.58	541-15-1	HMDB00062	11060	4.91E-01	9.02E-01	9.59E-01
Carnosine	277	Négatif	C9H14N4O3	225/0993	14.35	305-84-0	HMDB00033	15727	4.91E-01	5.12E-01	9.59E-01
Diglycolic-acid / Malic-acid	1213 / 15	Négatif	C4H6O5	133/0142	16.06	NA / 6915-15-7	NA / HMDB00744	NA / 6650	4.91E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Penicillamine / Methionine1	1065 / 28	Négatif	C5H11NO2S	148/0438	9.74	52-67-5 / 63-68-3	HMDB14997 / HMDB00696	50868 / 16643	4.91E-01	9.82E-01	9.59E-01
GMP1	185	Négatif	C10H14N5O8P	362/0507	16.82	85-32-5	HMDB01397	17345	4.91E-01	7.86E-01	9.69E-01
N6-N6-N6-Trimethyl-L-lysine	726	Positif	C9H20N2O2	189/1598	16.01	19253-88-4	HMDB01325	17311	4.94E-01	9.99E-01	9.99E-01
UDP	171	Positif	C9H14N2O12P2	405/0095	16.19	58-98-0	HMDB00295	17659	4.97E-01	9.70E-01	9.99E-01
X2-O-Methyladenosine	384	Positif	C11H15N5O4	282/1197	3.69	2140-79-6	HMDB04326	119928	4.97E-01	9.52E-01	9.99E-01
Shikimic-acid	47	Négatif	C7H10O5	173/0455	14.33	138-59-0	HMDB03070	16119	5.31E-01	9.82E-01	9.59E-01
Cytidine2	10	Positif	C9H13N3O5	244/0928	10.19	65-46-3	HMDB00089	17562	5.40E-01	8.37E-01	9.99E-01
N6-Acetyl-L-lysine	728	Négatif	C8H16N2O3	187/1088	12.02	692-04-6	HMDB00206	17752	5.59E-01	9.82E-01	9.59E-01
Guanosine	5	Positif	C10H13N5O5	284/099	11.52	118-00-3	HMDB00133	16750	5.65E-01	9.59E-01	9.99E-01
Fumaric-acid	12	Négatif	C4H4O4	115/0037	16.06	110-17-8	HMDB00134	18012	5.75E-01	9.82E-01	9.59E-01
X2-Deoxyuridine / Deoxyuridine	895 / 148	Négatif	C9H12N2O5	227/0673	4.47	951-78-0 / 951-78-0	HMDB00012 / HMDB00012	16450 / 1645	5.75E-01	9.82E-01	9.59E-01
NAD	59	Négatif	C21H27N7O14P2	662/1018	14.76	53-84-9	HMDB00902	15846	5.80E-01	9.82E-01	9.59E-01
Dimethyl-oxalate / Erythrono-1-4-lactone / Methylmalonic-acid / Succinic-acid	966 / 975 / 225 / 18	Négatif	C4H6O4	117/0193	15.53	553-90-2 / 17675-99-9 / 516-05-2 / 110-15-6	NA / HMDB00349 / HMDB00202 / HMDB00254	6859 / 290972 / 30860 / 15741	5.87E-01	9.82E-01	9.59E-01
Orotic-acid	227	Négatif	C5H4N2O4	155/0098	9.78	65-86-1	HMDB00226	16742	5.87E-01	9.82E-01	9.69E-01
Creatine1	694	Négatif	C4H9N3O2	130/0622	13.61	57-00-1	HMDB00064	16919	5.97E-01	9.82E-01	9.59E-01
ADP	178	Positif	C10H15N5O10P2	428/0367	15.56	58-64-0	HMDB01341	16761	6.24E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Myo-inositol-1-4-bisphosphate / Fructose-1-6-bisphosphate / D-Glucose-1-6-bisphosphate / 2	493 / 246 / 420	Positif	C6H14O12P2	341/0033	17.58	47055-78-7 / 488-69-7 / 10139-18-1	HMDB00968 / HMDB01058 / HMDB03514	NA / 16905 / 18148	6.24E-01	9.52E-01	9.99E-01
D-Penicillamine / Methionine	1065 / 28	Positif	C5H11NO2S	150/0583	9.81	52-67-5 / 63-68-3	HMDB14997 / HMDB00696	50868 / 16643	6.24E-01	9.59E-01	9.99E-01
Xanthine	123	Positif	C5H4N4O2	153/0407	11.39	69-89-6	HMDB00292	17712	6.24E-01	9.59E-01	9.99E-01
N-acetyl-L-glutamine	890	Positif	C7H12N2O4	189/087	11.13	2490-97-3	HMDB06029	73685	6.25E-01	8.34E-01	9.99E-01
Adenine1	111	Négatif	C5H5N5	134/0472	6.12	73-24-5	HMDB00034	16708	6.32E-01	9.02E-01	9.69E-01
Cytidine-5-diphosphocholine1	463	Négatif	C14H26N4O11P2	487/1001	15.69	987-78-0	HMDB01413	16436	6.32E-01	9.42E-01	9.59E-01
D-2-Hydroxyglutaric-acid	803	Négatif	C5H8O5	147/0299	15.53	2889-31-8	HMDB00606	32796	6.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Glucosamine-6-phosphate / 1	701	Négatif	C6H14NO8P	258/0384	16.16	3616-42-0	HMDB01254	15873	6.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
Galactonic-acid / Gluconic-acid1	1053 / 831	Négatif	C6H12O7	195/051	14.21	13382-27-9 / 526-95-4	HMDB00565 / HMDB00625	16534 / 33198	6.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
Glycerol-3-phosphate1	1086	Négatif	C3H9O6P	171/0064	14.21	57-03-4	HMDB00126	15978	6.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
Inosine1	54	Négatif	C10H12N4O5	267/0735	10.39	58-63-9	HMDB00195	17596	6.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
N-acetyl-DL-glutamic-acid / N-Acetyl-L-glutamic-acid	898 / 576	Négatif	C7H11NO5	188/0564	14.87	1188-37-0 / 1188-37-0	HMDB01138 / HMDB01138	12575 / 12575	6.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
N-Acetyl-L-tyrosine	730	Négatif	C11H13NO4	222/0772	7.92	537-55-3	HMDB00866	21563	6.32E-01	9.02E-01	9.69E-01
Phosphoenolpyruvic-acid	254	Négatif	C3H5O6P	166/9751	17.19	138-08-9	HMDB00263	44897	6.32E-01	9.02E-01	9.59E-01
Serine1	37	Négatif	C3H7NO3	104/0353	14.25	56-45-1	HMDB00187	17115	6.32E-01	9.82E-01	9.59E-01
Cytidine	10	Positif	C9H13N3O5	244/0928	10.73	65-46-3	HMDB00089	17562	6.33E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Myo-inositol-1-4-bisphosphate / Fructose-1-6-bisphosphate / D-Glucose-1-6-bisphosphate	493 / 246 / 420	Positif	C6H14O12P2	341/0033	18.1	47055-78-7 / 488-69-7 / 10139-18-1	HMDB00968 / HMDB01058 / HMDB03514	NA / 16905 / 18148	6.33E-01	9.59E-01	9.99E-01
Guanine	1102	Positif	C5H5N5O	152/0567	11.52	73-40-5	HMDB00132	16235	6.33E-01	9.59E-01	9.99E-01
L-Proglutamic-acid	950	Positif	C5H7NO3	130/0499	15.31	98-79-3	HMDB00267	18183	6.33E-01	8.37E-01	9.99E-01
Lysine	23	Positif	C6H14N2O2	147/1128	16.77	56-87-1	HMDB00182	18019	6.33E-01	9.59E-01	9.99E-01
N-Acetyl-Asp-Glu	570	Positif	C11H16N2O8	305/0979	16.91	NA	NA	NA	6.33E-01	9.59E-01	9.99E-01
Proline	21	Positif	C5H9NO2	116/0706	11.7	147-85-3	HMDB00162	17203	6.33E-01	9.59E-01	9.99E-01
X5-Deoxy-5-methylthio-adenosine	404	Positif	C11H15N5O3S	298/0968	2.92	2457-80-9	HMDB01173	17509	6.33E-01	9.52E-01	9.99E-01
D-Fructose-1-phosphate / D-Fructose-6-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Glucose-6-PO4 / Mannose-1-phosphate	477 / 700 / 490 / 1186 / 281 / 65 / 416	Négatif	C6H13O9P	259/0224	16.65	15978-08-2 / 643-13-0 / 3672-15-9 / 2255-14-3 / 59-56-3 / 56-73-5 / 27251-84-9	HMDB01076 / HMDB00124 / HMDB01078 / HMDB00645 / HMDB01586 / HMDB01401 / HMDB06330	704854 / 15946 / 49728 / 17973 / 16077 / 4170 / 35374	6.34E-01	9.82E-01	9.59E-01
N-Acetyl-D-penicillamine	318	Négatif	C7H13NO3S	190/0543	2.19	15537-71-0	NA	61198	6.45E-01	5.12E-01	9.59E-01
X2-Deoxyribose-5-phosphate	832	Négatif	C5H11O7P	213/017	14.19	102916-66-5	HMDB01031	16132	6.45E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Proglutamic-acid	352	Négatif	C5H7NO3	128/0353	10.59	4042-36-8	HMDB00805	16010	6.59E-01	5.12E-01	9.59E-01
N-acetyl-L-glutamine1	890	Négatif	C7H12N2O4	187/0724	11.16	2490-97-3	HMDB06029	73685	6.76E-01	8.42E-01	9.69E-01
Citric-acid / Isocitric-acid	14 / 46	Négatif	C6H8O7	191/0197	17.62	77-92-9 / 320-77-4	HMDB00094 / HMDB00193	30769 / 30887	6.79E-01	9.82E-01	9.59E-01
L-Cysteine-S-sulfate	717	Négatif	C3H7NO5S2	199/9693	17.08	1637-71-4	HMDB00731	27891	6.81E-01	9.82E-01	9.59E-01
Xanthine	123	Négatif	C5H4N4O2	151/0262	11.41	69-89-6	HMDB00292	17712	6.81E-01	9.82E-01	9.59E-01
Alanine / Sarcosine / Alanine1	29 / 168 / 339	Négatif	C3H7NO2	88/0404	13.61	56-41-7 / 107-97-1 / 107-95-9	HMDB00161 / HMDB00271 / HMDB00056	16977 / 15611 / 16958	6.81E-01	9.82E-01	9.59E-01
Thymidine	9	Négatif	C10H14N2O5	241/083	3.07	50-89-5	HMDB00273	17748	6.81E-01	9.82E-01	9.59E-01
X3-5-Dihydroxy-phenylglycine	979	Négatif	C8H9NO4	182/0459	14.89	162870-29-3	NA	NA	6.81E-01	9.82E-01	9.77E-01
Azelaic-acid	295	Négatif	C9H16O4	187/0976	12.44	123-99-9	HMDB00784	48131	6.84E-01	9.82E-01	9.59E-01
Uridine	998	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	7.7	58-96-8	HMDB00296	16704	6.84E-01	9.82E-01	9.59E-01
X3-Hydroxy-3-methylglutaric-acid	676	Négatif	C6H10O5	161/0455	14.78	503-49-1	HMDB00355	16831	6.84E-01	9.82E-01	9.59E-01
N-Acetylneuraminic-acid	801	Positif	C11H19NO9	310/1133	13.89	131-48-6	HMDB00230	45744	7.17E-01	9.59E-01	9.99E-01

D-Fructose-1-phosphate / D-Fructose-6-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Glucose-6-PO4 / Mannose-1-phosphate / 1	477 / 700 / 490 / 1186 / 281 / 65 / 416	Négatif	C6H13O9P	259/0224	16.04	15978-08-2 / 643-13-0 / 3672-15-9 / 2255-14-3 / 59-56-3 / 56-73-5 / 27251-84-9	HMDB01076 / HMDB00124 / HMDB01078 / HMDB00645 / HMDB01586 / HMDB01401 / HMDB06330	704854 / 15946 / 49728 / 17973 / 16077 / 4170 / 35374	7.21E-01	9.82E-01	9.70E-01
D-Pyroglytamic-acid1	352	Négatif	C5H7NO3	128/0353	10.24	4042-36-8	HMDB00805	16010	7.21E-01	5.12E-01	9.59E-01
X4-Hydroxybenzaldehyde	294	Négatif	C7H6O2	121/0295	2.13	123-08-0	HMDB11718	17597	7.24E-01	9.82E-01	9.59E-01
Panthenol2	253	Positif	C9H19NO4	206/1387	2.08	81-13-0	HMDB04231	27373	7.26E-01	9.59E-01	9.99E-01
ADP1	178	Négatif	C10H15N5O10P2	426/0221	15.57	58-64-0	HMDB01341	16761	7.28E-01	9.82E-01	9.59E-01
Prostaglandin-E1 / 1	609	Négatif	C20H34O5	353/2333	2.01	745-65-3	HMDB01442	15544	7.28E-01	9.82E-01	9.59E-01
Betaine1	439	Négatif	C5H11NO2	116/0717	9.65	107-43-7	HMDB00043	17750	7.30E-01	9.82E-01	9.69E-01
D-Threitol / Erythritol	324 / 8	Négatif	C4H10O4	121/0506	9.59	2418-52-2 / 149-32-6	HMDB04136 / HMDB02994	48300 / 17113	7.30E-01	6.31E-01	9.59E-01
Guanosine-5-diphospho-D-mannose / Guanosine-5-diphosphoglucose1	710 / 711	Négatif	C16H25N5O16P2	604/0699	17.88	3123-67-9 / NA	HMDB01163 / NA	15820 / NA	7.30E-01	9.87E-01	9.94E-01
L-a-Glycerophosphorylcholine1	716	Négatif	C8H20NO6P	256/0955	11.57	28319-77-9	HMDB00086	16870	7.30E-01	9.02E-01	9.59E-01
N-Acetyl-a-D-glucosamine-1-phosphate / N-Acetyl-D-glucosamine-6-phosphate	569 / 573	Négatif	C8H16NO9P	300/049	15.4	901851-43-2 / 102029-88-9	HMDB01367 / HMDB01062	7125 / 15783999999	7.30E-01	8.67E-01	9.59E-01
UDP-N-acetylglucosamine	1164	Négatif	C17H27N3O17P2	606/0743	16.16	528-04-1	HMDB00290	16264	7.30E-01	9.82E-01	9.59E-01
Dihydrothymine	1114	Négatif	C5H8N2O2	127/0515	2.03	696-04-8	HMDB00079	27468	7.55E-01	9.82E-01	9.59E-01
L-Glutamic-acid1	222	Négatif	C5H9NO4	146/0459	15.3	56-86-0	HMDB00148	16015	7.55E-01	7.86E-01	9.59E-01
Panthenol1	253	Négatif	C9H19NO4	204/1241	2.76	81-13-0	HMDB04231	27373	7.55E-01	9.82E-01	9.69E-01
Sebacic-acid	13	Négatif	C10H18O4	201/1132	11.38	111-20-6	HMDB00792	41865	7.55E-01	9.82E-01	9.59E-01
Suberic-acid	16	Négatif	C8H14O4	173/0819	13.36	505-48-6	HMDB00893	9300	7.55E-01	9.82E-01	9.59E-01
Thymine	1059	Négatif	C5H6N2O2	125/0357	3.09	65-71-4	HMDB00262	17821	7.55E-01	8.67E-01	9.59E-01
Adenine	111	Positif	C5H5N5	136/0618	6.23	73-24-5	HMDB00034	16708	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Ala-D-Ala	470	Positif	C6H12N2O3	161/0921	12.45	923-16-0	HMDB03459	16576	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Glucosamine-6-phosphate	701	Positif	C6H14NO8P	260/053	15.93	3616-42-0	HMDB01254	15873	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Mannitol-1-phosphate	489	Positif	C6H15O9P	263/0527	15.27	15806-48-1	HMDB01530	16298	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
Glucose-6-PO4 / Mannose-1-phosphate / Galactose-1-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / D-Fructose-1-phosphate	65 / 416 / 1186 / 490 / 477	Positif	C6H13O9P	261/037	16.91	56-73-5 / 27251-84-9 / 2255-14-3 / 3672-15-9 / 15978-08-2	HMDB01401 / HMDB06330 / HMDB00645 / HMDB01078 / HMDB01076	4170 / 35374 / 17973 / 49728 / 704854	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
Glycerol-3-phosphate	1086	Positif	C3H9O6P	173/021	15.41	57-03-4	HMDB00126	15978	7.58E-01	9.52E-01	9.99E-01
Guanidineacetic-acid	263	Positif	C3H7N3O2	118/0611	14.45	352-97-6	HMDB00128	16344	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
Guanosine-5-diphospho-D-mannose / Guanosine-5-diphosphoglucose	710 / 711	Positif	C16H25N5O16P2	606/0844	17.85	3123-67-9 / NA	HMDB01163 / NA	15820 / NA	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
Imidazolelactic-acid	283	Positif	C6H8N2O3...	157/0608	11.09	876-19-7	HMDB02320	27487	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
Inosine	54	Positif	C10H12N4O5	269/0881	10.42	58-63-9	HMDB00195	17596	7.58E-01	8.37E-01	9.99E-01
L-Glutamic-acid	222	Positif	C5H9NO4	148/0605	15.31	56-86-0	HMDB00148	16015	7.58E-01	8.37E-01	9.99E-01
L-Glutathione-oxidized	811	Positif	C20H32N6O12S2	613/1592	17.5	27025-41-8	HMDB03337	17858	7.58E-01	8.34E-01	9.99E-01
L-Pyroglytamic-acid3	950	Positif	C5H7NO3	130/0499	13.99	98-79-3	HMDB00267	18183	7.58E-01	8.37E-01	9.99E-01
N-acetyl-DL-glutamic-acid	898	Positif	C7H11NO5	190/071	14.88	1188-37-0	HMDB01138	12575	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
N-Acetylglycine	308	Positif	C4H7NO3	118/0499	10.54	543-24-8	HMDB00532	40410	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
N-Acetyl-L-asparagine	887	Positif	C6H10N2O4	175/0713	12.33	4033-40-3	HMDB06028	NA	7.58E-01	9.70E-01	9.99E-01
N-Acetyl-L-aspartic-acid	575	Positif	C6H9NO5	176/0553	15.16	997-55-7	HMDB00812	21547	7.58E-01	8.88E-01	9.99E-01
N-Acetyl-L-carnosine	1121	Positif	C11H16N4O4	269/1244	10.6	56353-15-2	HMDB12881	67249	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
Panthenol	253	Positif	C9H19NO4	206/1387	2.77	81-13-0	HMDB04231	27373	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
Propionylcarnitine	1117	Positif	C10H19NO4	218/1387	8.54	17298-37-2	HMDB00824	28867	7.58E-01	8.37E-01	9.99E-01
Taurine	32	Positif	C2H7NO3S	126/0219	14.05	107-35-7	HMDB00251	15891	7.58E-01	7.94E-01	9.99E-01
Triethanolamine	817	Positif	C6H15NO3	150/1125	3.6	102-71-6	HMDB32538	28621	7.58E-01	8.37E-01	9.99E-01
UDP	171	Positif	C9H14N2O12P2	405/0095	16.93	58-98-0	HMDB00295	17659	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
UDP-N-acetylglucosamine	1164	Positif	C17H27N3O17P2	608/0889	16.19	528-04-1	HMDB00290	16264	7.58E-01	9.59E-01	9.99E-01
X1-Methylhistidine	41	Positif	C7H11N3O2	170/0924	11.31	332-80-9	HMDB00001	50599	7.58E-01	9.52E-01	9.99E-01
X3-Methylcrotonyl-glycine / N-Tiglylglycine	1137 / 1136	Positif	C7H11NO3	158/0812	3.71	33008-07-0 / 35842-45-6	HMDB00459 / HMDB00959	68499 / 73018	7.58E-01	7.94E-01	9.99E-01
Nicotinamide1	581	Négatif	C6H6N2O	121/0407	2.8	98-92-0	HMDB01406	17154	7.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Glutamine / L-Glutamine	247 / 24	Positif	C5H10N2O3	147/0764	13.99	5959-95-5 / 56-85-9	HMDB03423 / HMDB00641	17061 / 1805	7.64E-01	8.88E-01	9.99E-01
L-Cysteinesulfonic-acid	547	Négatif	C3H7NO4S	152/0023	8.76	1115-65-7	HMDB00996	41721	7.76E-01	7.86E-01	9.59E-01
N-Acetyl-Asp-Glu1	570	Négatif	C11H16N2O8	303/0834	16.9	NA	NA	NA	7.76E-01	9.82E-01	9.77E-01
L-Pyroglytamic-acid2	950	Négatif	C5H7NO3	128/0353	15.3	98-79-3	HMDB00267	18183	7.85E-01	7.86E-01	9.59E-01
Betaine	439	Positif	C5H11NO2	118/0863	9.66	107-43-7	HMDB00043	17750	7.87E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Ribose-1-phosphate / D-Ribose-5-phosphate / D-Ribulose-5-phosphate / D-Xylulose-5-phosphate1	494 / 152 / 495 / 497	Négatif	C5H11O8P	229/0119	15.4	14075-00-4 / 3615-55-2 / 4151-19-3 / 4212-65-1	HMDB01489 / HMDB01548 / HMDB00618 / HMDB00868	16300 / 52742 / 17797 / 16332	7.87E-01	9.82E-01	9.69E-01
L-Aspartic-acid1	266	Négatif	C4H7NO4	132/0302	15.28	56-84-8	HMDB00191	17053	7.87E-01	9.82E-01	9.59E-01
Cystathionine	127	Positif	C7H14N2O4S	223/0747	17.72	535-34-2	HMDB00455	NA	7.89E-01	8.88E-01	9.99E-01
Pipecolic-acid	272	Positif	C6H11NO2	130/0863	11.11	535-75-1	HMDB00070	17964	7.89E-01	8.37E-01	9.99E-01
D-Mannitol-1-phosphate1	489	Négatif	C6H15O9P	261/0381	15.57	15806-48-1	HMDB01530	16298	7.90E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Saccharic-acid	1142	Négatif	C6H10O8	209/0303	17.06	25255-21-7	HMDB00663	16002	7.92E-01	9.82E-01	9.16E-01
Phosphonoacetic-acid	601	Négatif	C2H5O5P	138/9802	15.85	4408-78-0	HMDB04110	15732	8.11E-01	7.69E-01	9.59E-01
L-Histidinol	719	Négatif	C6H11N3O	140/0829	10.63	4836-52-6	HMDB03431	16255	8.16E-01	5.42E-01	9.59E-01
Cystathionine1	127	Négatif	C7H14N2O4S	221/0602	15.77	535-34-2	HMDB00455	NA	8.16E-01	8.67E-01	9.59E-01
Galactonic-acid / Gluconic-acid	1053 / 831	Négatif	C6H12O7	195/051	14.5	13382-27-9 / 526-95-4	HMDB00565 / HMDB00625	16534 / 33198	8.23E-01	9.82E-01	9.59E-01
Caproic-acid	44	Négatif	C6H12O2	115/0765	2.03	142-62-1	HMDB00535	30776	8.36E-01	9.02E-01	9.59E-01
L-Cystine	267	Positif	C6H12N2O4S2	241/0312	15.66	56-89-3	HMDB00192	16283	8.40E-01	8.37E-01	9.99E-01
D-Arabinose	325	Négatif	C5H10O5	149/0455	12.08	147-81-9	HMDB29942	46983	8.44E-01	9.82E-01	9.69E-01
Imidazolelactic-acid1	283	Négatif	C6H8N2O3...	155/0462	11.08	876-19-7	HMDB02320	27487	8.44E-01	9.82E-01	9.59E-01
X2-hydroxycaproic-acid	194	Négatif	C6H12O3	131/0713	2.03	6064-63-7	HMDB01624	86542	8.44E-01	7.69E-01	9.77E-01
X4-Acetamidobutanoic-acid	1051	Négatif	C6H11NO3	144/0666	9.07	3025-96-5	HMDB03681	17645	8.44E-01	9.02E-01	9.59E-01
X5-Aminimidazole-4-carboxamide-1b-D-ribofuranosyl-5-monophosphate	653	Négatif	C9H15N4O8P	337/0555	15.57	NA	NA	NA	8.44E-01	7.83E-01	9.59E-01
Guanosine-5-diphospho-L-fucose	523	Négatif	C16H25N5O15P2	588/075	17.53	15839-70-0	HMDB01095	17009	8.44E-01	9.82E-01	9.69E-01
Glutathione	130	Positif	C10H17N3O6S	308/0911	18.42	70-18-8	HMDB00125	16856	8.52E-01	9.59E-01	9.99E-01
L-Glutathione-oxidized1	811	Négatif	C20H32N6O12S2	611/1447	17.49	27025-41-8	HMDB03337	17858	8.53E-01	7.69E-01	9.59E-01
Pyrrrole-2-carboxylic-acid	329	Négatif	C5H5NO2	110/0247	7.7	634-97-9	HMDB04230	36751	8.53E-01	9.82E-01	9.59E-01
Tetradecanedioic-acid	745	Négatif	C14H26O4	257/1758	8.14	821-38-5	HMDB00872	NA	8.53E-01	9.80E-01	9.59E-01
X2-2-Dimethylsuccinic-acid / 2-Methylglutaric-acid / 3-Methylglutaric-acid / Adipic-acid	894 / 965 / 987 / 17	Négatif	C6H10O4	145/0506	14.83	597-43-3 / 617-62-9 / 626-51-7 / 124-04-9	HMDB00422 / HMDB00752 / HMDB00448	86537 / 68567 / 68566 / 30832	8.55E-01	9.82E-01	9.59E-01
Hypoxanthine	986	Positif	C5H4N4O	137/0458	8.83	68-94-0	HMDB00157	17368	8.57E-01	9.59E-01	9.99E-01

a-Ketoglutaric-acid	422	Négatif	C5H6O5	145/0142	14.93	328-50-7	HMDB00208	30915	8.58E-01	7.83E-01	9.59E-01
Citraconic-acid / Glutaconic-acid / Itaconic-acid / Mesaconic-acid	451 / 516 / 540 / 562	Négatif	C5H6O4	129/0193	15.52	498-23-7 / 1724-02-3 / 97-65-4 / 498-24-8	HMDB00634 / HMDB00620 / HMDB02092 / HMDB00749	17626 / 15670 / 30838 / 16600	8.58E-01	7.86E-01	9.59E-01
Dihydroxyacetone-phosphate	279	Négatif	C3H7O6P...	168/9907	15.69	57-04-5	HMDB01473	16108	8.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Sedoheptulose-7-phosphate	1182	Négatif	C7H15O10P	289/033	16.27	2646-35-7	HMDB01068	15721	8.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
Hexadecanedioic-acid	264	Négatif	C16H30O4	285/2071	2.03	505-54-4	HMDB00672	73722	8.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
Lysine1	23	Négatif	C6H14N2O2	145/0983	16.76	56-87-1	HMDB00182	18019	8.58E-01	9.36E-01	9.59E-01
N-Acetylglycine1	308	Négatif	C4H7NO3	116/0353	11.08	543-24-8	HMDB00532	40410	8.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
N-Glycylneuraminic-acid	580	Négatif	C11H19NO10	324/0936	14.81	1113-83-3	HMDB00833	62084	8.58E-01	9.82E-01	9.69E-01
Succinic-acid / Methylmalonic-acid	18 / 225	Négatif	C4H6O4	117/0193	15.92	110-15-6 / 516-05-2	HMDB00254 / HMDB00202	15741 / 3086	8.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
Uric-acid	274	Négatif	C5H4N4O3	167/021	12.52	69-93-2	HMDB00289	17775	8.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
Uridine-5-diphosphogalactose	644	Négatif	C15H24N2O17P2	565/0477	16.94	2956-16-3	HMDB00302	67119	8.58E-01	9.82E-01	9.59E-01
X1-Methylhydantoin / Dihydrouracil	363 / 893	Négatif	C4H6N2O2	113/0356	2.95	616-04-6 / 504-07-4	HMDB03646 / HMDB00076	16354 / 15901	8.58E-01	7.86E-01	9.59E-01
Butyryl-carnitine	1134	Positif	C11H21NO4	232/1543	7.24	25576-40-3	HMDB02013	7676	8.65E-01	8.37E-01	9.99E-01
cis-4-hydroxy-D-proline / trans-4-hydroxy-L-proline	96 / 889	Négatif	C5H9NO3	130/051	15.2	2584-71-6 / 51-35-4	HMDB06460 / HMDB00725	16231 / 18095	8.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
Hypoxanthine1	986	Négatif	C5H4N4O	135/0312	8.84	68-94-0	HMDB00157	17368	8.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
N-Acetyl-L-asparagine1	887	Négatif	C6H10N2O4	173/0568	11.73	4033-40-3	HMDB06028	NA	8.70E-01	5.12E-01	9.59E-01
Pipecolic-acid1	272	Négatif	C6H11NO2	128/0717	11.12	535-75-1	HMDB00070	17964	8.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
Sucrose	64	Négatif	C12H22O11	341/1089	14.45	57-50-1	HMDB00258	17992	8.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
Guanidinossuccinic-acid	282	Positif	C5H9N3O4	176/0666	15.45	6133-30-8	HMDB03157	17072	8.76E-01	8.37E-01	9.99E-01
Nicotinamide	581	Positif	C6H6N2O	123/0553	2.81	98-92-0	HMDB01406	17154	8.76E-01	9.59E-01	9.99E-01
Serine	37	Positif	C3H7NO3	106/0499	14.16	56-45-1	HMDB00187	17115	8.76E-01	7.94E-01	9.99E-01
Thyrotropin-releasing-hormone	747	Positif	C16H22N6O4	363/1775	7.87	NA	HMDB60080	NA	8.76E-01	9.59E-01	9.99E-01
Myo-inositol	76	Négatif	C6H12O6	179/0561	15.92	87-89-8	HMDB00211	17268	8.81E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Mannitol-1-phosphate2	489	Négatif	C6H15O9P	261/0381	16.12	15806-48-1	HMDB01530	16298	8.82E-01	9.82E-01	9.59E-01
L-Cystine1	267	Négatif	C6H12N2O4S2	239/0166	15.59	56-89-3	HMDB00192	16283	8.88E-01	7.86E-01	9.59E-01
UDP	171	Négatif	C9H14N2O12P2	402/9949	16.04	58-98-0	HMDB00295	17659	8.88E-01	9.82E-01	9.59E-01
L-Aspartic-acid	266	Positif	C4H7NO4	134/0448	15.21	56-84-8	HMDB00191	17053	9.04E-01	9.59E-01	9.99E-01
D-Fructose-1-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / Galactose-1-phosphate / Glucose-6-PO4 / Glucose-1-phosphate / Mannose-1-phosphate	477 / 490 / 1186 / 65 / 281 / 416	Positif	C6H13O9P	261/037	16.62	15978-08-2 / 3672-15-9 / 2255-14-3 / 56-73-5 / 59-56-3 / 27251-84-9	HMDB01076 / HMDB01078 / HMDB00645 / HMDB01401 / HMDB01586 / HMDB06330	704854 / 49728 / 17973 / 4170 / 16077 / 35374	9.08E-01	9.59E-01	9.99E-01
N-Acetyl-L-methionine	904	Positif	C7H13NO3S	192/0689	4.25	65-82-7	HMDB11745	21557	9.08E-01	7.94E-01	9.99E-01
S-Adenosyl-homocysteine	126	Positif	C14H20N6O5S	385/1289	12.66	979-92-0	HMDB00939	16680	9.08E-01	9.59E-01	9.99E-01
X2-Hydroxycaproic-acid	194	Négatif	C6H12O3	131/0713	2.78	6064-63-7	HMDB01624	86542	9.11E-01	9.82E-01	9.59E-01
cis-cis-Muconic-acid	447	Négatif	C6H6O4	141/0193	15.92	1119-72-8	HMDB06331	16508	9.27E-01	9.02E-01	9.59E-01
Cyclic-ADP-ribose	1001	Négatif	C15H21N5O13P2	540/0538	14.78	119340-53-3	NA	NA	9.27E-01	9.02E-01	9.59E-01
Acetyl-L-carnitin	86	Positif	C9H17NO4	204/123	10.01	3040-38-8	HMDB00201	73024	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
Alanine / Sarcosine / Alanine	29 / 168 / 339	Positif	C3H7NO2	90/055	13.64	56-41-7 / 107-97-1 / 107-95-9	HMDB00161 / HMDB00271 / HMDB00056	16977 / 15611 / 16958	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
Creatine	694	Positif	C4H9N3O2	132/0768	13.6	57-00-1	HMDB00064	16919	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
Cytidine-5-diphosphocholine	463	Positif	C14H26N4O11P2	489/1146	15.7	987-78-0	HMDB01413	16436	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
GDP	184	Positif	C10H15N5O11P2	444/0316	17.63	146-91-8	HMDB01201	17552	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
GTP	153	Positif	C10H16N5O14P3	523/9979	18.46	86-01-1	HMDB01273	15996	9.38E-01	7.94E-01	9.99E-01
L-a-Glycerophosphorylcholine	716	Positif	C8H20NO6P	258/1101	14.18	28319-77-9	HMDB00086	16870	9.38E-01	8.37E-01	9.99E-01
Methionine-sulfoxide	298	Positif	C5H11O3NS	166/0533	13	62697-73-8	HMDB02005	49033	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
Methylhistamine	1100	Positif	C6H11N3	126/1026	10.68	501-75-7	HMDB00898	29009	9.38E-01	7.94E-01	9.99E-01
Methylimidazoleacetic-acid	224	Positif	C6H8N2O2	141/0659	9.08	2625-49-2	HMDB02820	1606	9.38E-01	8.37E-01	9.99E-01
O-Phosphorylethanolamine	735	Positif	C2H8NO4P	142/0264	15.8	1071-23-4	HMDB00224	17553	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
Pyridoxamine-5-phosphate	614	Positif	C8H13N2O5P	249/0635	15.62	529-96-4	HMDB01555	18335	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
X4-Imidazoleacrylic-acid / 5-Aminopyridine-3-carboxylic-acid / 6-Aminopyridine-3-carboxylic-acid	677 / 1071 / 1079	Positif	C6H6N2O2	139/0502	10.91	104-98-3 / / 24242-19-1 / 3167-49-5	HMDB00301 / NA / NA	30817 / NA / NA	9.38E-01	9.59E-01	9.99E-01
Cyclic-AMP	241	Négatif	C10H12N5O6P	328/0452	9.9	60-92-4	HMDB00058	17489	9.47E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Ribose-1-phosphate / D-Ribose-5-phosphate / D-Ribulose-5-phosphate / D-Xylulose-5-phosphate	494 / 152 / 495 / 497	Négatif	C5H11O8P	229/0119	15.94	14075-00-4 / 3615-55-2 / 4151-19-3 / 4212-65-1	HMDB01489 / HMDB01548 / HMDB00618 / HMDB00868	16300 / 52742 / 17797 / 16332	9.50E-01	7.86E-01	9.59E-01
Imidazolelactic-acid2	283	Négatif	C6H8N2O3...	155/0462	11.77	876-19-7	HMDB02320	27487	9.50E-01	9.02E-01	9.59E-01
ATP / dGTP	55 / 182	Positif	C10H16N5O13P3	508/003	16.48	56-65-5 / 2564-35-4	HMDB00538 / HMDB01440	15422 / 16497	9.52E-01	9.59E-01	9.99E-01
Pro-Leu	1060	Positif	C11H20N2O3	229/1547	8.89	52899-07-7	NA	NA	9.52E-01	7.94E-01	9.99E-01
X2-Aminobenzoic-acid / Trigonelline	132 / 748	Positif	C7H7NO2	138/055	10.23	118-92-3 / 535-83-1	HMDB01123 / HMDB00875	30754 / 18123	9.52E-01	8.37E-01	9.99E-01
Fumaric-acid / Maleic-acid	12 / 556	Négatif	C4H4O4	115/0037	15.22	110-17-8 / 110-16-7	HMDB00134 / HMDB00176	18012 / 183	9.59E-01	9.82E-01	9.59E-01
Glutathione	130	Négatif	C10H17N3O6S	306/0765	16.76	70-18-8	HMDB00125	16856	9.59E-01	7.69E-01	9.59E-01
X6-Biopterin	407	Négatif	C9H11N5O3	236/0789	11.26	22150-76-1	HMDB00468	63931	9.61E-01	8.45E-01	9.69E-01
ATP / dGTP	55 / 182	Négatif	C10H16N5O13P3	505/9885	16.47	56-65-5 / 2564-35-4	HMDB00538 / HMDB01440	15422 / 16497	9.64E-01	9.82E-01	9.59E-01
Aspartylglycosamine	578	Négatif	C12H21N3O8	334/1256	14.97	2776-93-4	HMDB00489	17261	9.69E-01	9.82E-01	9.59E-01
O-Phosphorylethanolamine	735	Négatif	C2H8NO4P	140/0118	15.79	1071-23-4	HMDB00224	17553	9.69E-01	9.82E-01	9.59E-01
D-Glyceric-acid	480	Négatif	C3H6O4	105/0193	11.75	473-81-4	HMDB00139	32398	9.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
GDP	184	Négatif	C10H15N5O11P2	442/0171	17.64	146-91-8	HMDB01201	17552	9.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
Glycerol-3-phosphate	1086	Négatif	C3H9O6P	171/0064	15.38	57-03-4	HMDB00126	15978	9.70E-01	9.02E-01	9.59E-01
Imidazoleacetic-acid	219	Négatif	C5H6N2O2	125/0356	11.71	645-65-8	HMDB02024	16974	9.70E-01	7.86E-01	9.59E-01
L-Threonine-acid	552	Négatif	C4H8O5	135/0299	12.79	73411	HMDB00943	15908	9.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
N-Acetyl-DL-serine / O-Acetyl-L-serine	955 / 734	Négatif	C5H9NO4	146/0459	11.08	NA / 5147-00-2	HMDB02931 / HMDB03011	NA / 17981	9.70E-01	9.72E-01	9.59E-01
N-Formyl-L-methionine	579	Négatif	C6H11NO3S	176/0387	4.71	4289-98-9	HMDB01015	16552	9.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
Prostaglandin-E1	609	Négatif	C20H34O5	353/2333	2.7	745-65-3	HMDB01442	15544	9.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
S-Adenosyl-homocysteine	126	Négatif	C14H20N6O5S	383/1143	12.6	979-92-0	HMDB00939	16680	9.70E-01	9.82E-01	9.59E-01
Taurine	32	Négatif	C2H7NO3S	124/0074	14.02	107-35-7	HMDB00251	15891	9.70E-01	9.02E-01	9.59E-01
Glutathione	130	Négatif	C10H17N3O6S	306/0765	17.41	70-18-8	HMDB00125	16856	9.74E-01	5.12E-01	9.59E-01
mono-Methyl-adipate	315	Négatif	C7H12O4	159/0663	2.03	627-91-8	HMDB59722	70855	9.74E-01	9.82E-01	9.69E-01
N-Acetyl-L-aspartic-acid	575	Négatif	C6H9NO5	174/0408	15.2	997-55-7	HMDB00812	21547	9.74E-01	9.82E-01	9.59E-01
Alanine / Alanine	29 / 339	Négatif	C3H7NO2	88/0404	15.24	56-41-7 / 107-97-1 / 107-95-9	HMDB00161 / HMDB00056	16977 / 16958	9.86E-01	9.82E-01	9.59E-01
Allantoin	426	Négatif	C4H6N4O3	157/0367	12.6	97-59-6	HMDB00462	15676	9.86E-01	9.82E-01	9.59E-01
Orotidine	736	Négatif	C10H12N2O8	287/0521	13.32	314-50-1	HMDB00788	15842	9.86E-01	9.82E-01	9.59E-01
Riboflavin-5-monophosphate	741	Négatif	C17H21N4O9P	455/0973	12.58	146-17-8	HMDB01520	17621	9.86		

Tableau III. Métabolomique - Détail des résultats des analyses différentielles réalisées dans le bulbe olfactif

Métabolite	Identifiant CEA	Mode d'acquisition	Formule brute	Masse (m/z)	Temps de rétention (minutes)	Identifiant CAS	Identifiant HMDB	Identifiant ChEBI	FDR Régime post-sevrage	FDR Groupe maternel	FDR Interaction
X1-5-Anhydro-D-sorbitol	357	Négatif	C6H12O5	163/0612	10.16	154-58-5	HMDB02712	16070	1.00E-10	9.03E-01	9.72E-01
Pantothenic-acid	58	Positif	C9H17NO5	220/1118	8.77	79-83-4	HMDB00210	7916	1.30E-03	9.38E-01	9.97E-01
X3-Aminosalicylic-acid	675	Positif	C7H7NO3	154/0499	2.94	570-23-0	HMDB01972	89327	5.33E-03	9.21E-01	9.97E-01
L-Homoserine / Threonine / D-allo-Threonine1	20 / 31 / 471	Négatif	C4H9NO3	118/051	13.31	672-15-1 / 72-19-5 / 24830-94-2	HMDB00719 / HMDB00167 / HMDB04041	15699 / 16857 / 28718	1.03E-02	9.03E-01	9.72E-01
Pantothenic-acid1	58	Négatif	C9H17NO5	218/1034	8.74	79-83-4	HMDB00210	7916	1.03E-02	9.71E-01	9.72E-01
L-Saccharopine	810	Positif	C11H20N2O6	277/1394	16.02	997-68-2	HMDB00279	16927	1.41E-02	9.21E-01	9.97E-01
L-Saccharopine1	810	Négatif	C11H20N2O6	275/1249	16.01	997-68-2	HMDB00279	16927	1.76E-02	9.03E-01	9.83E-01
X3-Hydroxybutyric-acid1	356	Négatif	C4H8O3	103/0401	8.64	6168-83-8	HMDB00442	17290	2.12E-02	9.03E-01	9.72E-01
gamma-Linolenic-acid	707	Négatif	C18H30O2	277/2173	1.43	506-26-3	HMDB03073	28661	2.12E-02	9.03E-01	9.72E-01
cis-5-8-11-14-17-Eicosapentaenoic-acid	448	Négatif	C20H30O2	301/2173	1.39	10417-94-4	HMDB01999	28364	2.12E-02	9.82E-01	9.83E-01
cis-8-11-14-Eicosatrienoic-acid	449	Négatif	C20H34O2	305/2486	1.37	1783-84-2	HMDB02925	53486	2.12E-02	9.71E-01	9.72E-01
L-Homoserine / Threonine / D-allo-Threonine	20 / 31 / 471	Positif	C4H9NO3	120/0655	13.32	672-15-1 / 72-19-5 / 24830-94-2	HMDB00719 / HMDB00167 / HMDB04041	15699 / 16857 / 28718	2.12E-02	9.21E-01	9.97E-01
trans-4-hydroxy-L-proline	889	Négatif	C5H9NO3	130/051	14.36	51-35-4	HMDB00725	18095	3.38E-02	9.71E-01	9.72E-01
Lysine	23	Positif	C6H14N2O2	147/1128	16.77	56-87-1	HMDB00182	18019	4.27E-02	9.21E-01	9.97E-01
Sarcosine / Alanine / Alanine	168 / 29 / 339	Positif	C3H7NO2	90/055	14.25	107-97-1 / 56-41-7 / 107-95-9	HMDB00271 / HMDB00161 / HMDB00056	15611 / 16977 / 16958	7.94E-02	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetylgalactosamine / N-Acetylmannosamine	161 / 162	Négatif	C8H15NO6	220/0827	11.22	1811-31-0 / 3615-17-6	HMDB00212 / HMDB01129	40356 / 63154	1.39E-01	9.03E-01	9.83E-01
Lysine1	23	Négatif	C6H14N2O2	145/0983	16.76	56-87-1	HMDB00182	18019	1.56E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-a-acetyl-L-arginine	1177	Positif	C8H16O3N4	217/1295	14.1	155-84-0	HMDB04620	40521	1.87E-01	9.21E-01	9.97E-01
X3-Methylhistidine / Methyl-DL-histidine / 1-Methylhistidine	1013 / 1072 / 41	Positif	C7H11N3O2	170/0924	12.2	368-16-1 / NA / 332-80-9	HMDB00479 / NA / HMDB00001	27596 / NA / 50599	2.32E-01	9.21E-01	9.97E-01
Serine	37	Positif	C3H7NO3	106/0499	14.16	56-45-1	HMDB00187	17115	2.32E-01	9.38E-01	9.97E-01
L-a-Glycerophosphorylcholine	716	Positif	C8H20NO6P	258/1101	14.18	28319-77-9	HMDB00086	16870	2.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
X5-Deoxy-5-methylthio-adenosine	404	Positif	C11H15N5O3S	298/0968	2.88	2457-80-9	HMDB01173	17509	2.92E-01	9.21E-01	9.97E-01
X2-Hydroxy-2-methylbutyric-acid / 3-Hydroxy-3-methylbutyric-acid	967 / 976	Négatif	C5H10O3	117/0557	3.78	3739-30-8 / 625-08-1	HMDB01987 / HMDB00754	68454 / 37084	2.92E-01	9.27E-01	9.72E-01
D-Ala-D-Ala1	470	Négatif	C6H12N2O3	159/0775	12.51	923-16-0	HMDB03459	16576	2.92E-01	9.03E-01	9.72E-01
X3-Methylhistidine / Methyl-DL-histidine / 1-Methylhistidine1	1013 / 1072 / 41	Négatif	C7H11N3O2	168/0778	12.23	368-16-1 / NA / 332-80-9	HMDB00479 / NA / HMDB00001	27596 / NA / 50599	2.92E-01	9.03E-01	9.72E-01
Indolelactic-acid	221	Négatif	C11H11NO3	204/0666	5.8	1821-52-9	HMDB00671	24813	2.92E-01	9.03E-01	9.72E-01
Serine1	37	Négatif	C3H7NO3	104/0353	14.19	56-45-1	HMDB00187	17115	2.92E-01	9.03E-01	9.72E-01
X2-Hydroxy-3-methylbutyric-acid	903	Négatif	C5H10O3	117/0557	3.75	4026-18-0	HMDB00407	60645	3.61E-01	9.43E-01	9.72E-01
X5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1b-D-ribofuranoside	953	Négatif	C9H14N4O5	257/0891	8.99	3031-94-5	HMDB01517	18406	3.61E-01	9.03E-01	9.72E-01
Glycerol-3-phosphate1	1086	Négatif	C3H9O6P	171/0064	14.22	57-03-4	HMDB00126	15978	3.61E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Threitol / Erythritol	324 / 8	Négatif	C4H10O4	121/0506	9.6	2418-52-2 / 149-32-6	HMDB04136 / HMDB02994	48300 / 17113	3.95E-01	9.75E-01	9.72E-01
Hypoxanthine1	986	Négatif	C5H4N4O	135/0312	8.87	68-94-0	HMDB00157	17368	4.45E-01	9.03E-01	9.72E-01
Dulcitol / D-Mannitol	1187 / 978	Négatif	C6H14O6	181/0718	12.78	608-66-2 / 69-65-8	HMDB00107 / HMDB00765	16813 / 16899	4.45E-01	9.03E-01	9.72E-01
X4-Amino-nicotinic-acid1	1073	Négatif	C6H6N2O2	137/0357	8.9	7418-65-7	NA	NA	4.45E-01	9.03E-01	9.72E-01
Carnitine1	92	Négatif	C7H15NO3	160/0979	12.57	541-15-1	HMDB00062	11060	4.45E-01	9.03E-01	9.72E-01
Uracil	170	Négatif	C4H4N2O2	111/02	4.19	66-22-8	HMDB00300	17568	4.45E-01	9.03E-01	9.83E-01
O-Acetyl-L-serine / N-Acetyl-DL-serine	734 / 955	Positif	C5H9NO4	148/0605	11.85	5147-00-2 / NA	HMDB03011 / HMDB02931	17981 / NA	4.91E-01	9.21E-01	9.97E-01
Alpha-D-Aminoapic-acid1	113	Négatif	C6H11NO4	160/0615	15.39	542-32-5	HMDB00510	37024	5.44E-01	9.05E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-methionine1	904	Négatif	C7H13NO3S	190/0543	4.33	65-82-7	HMDB11745	21557	5.46E-01	9.46E-01	9.72E-01
N-Acetyl-Asp-Glu1	570	Négatif	C11H16N2O8	303/0834	16.93	NA	NA	NA	5.46E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Lactic-acid / Glyceraldehyde	243 / 287	Négatif	C3H6O3	89/0244	8.7	10326-41-7 / 56-82-6	HMDB01311 / HMDB01051	341 / 5445	5.46E-01	9.03E-01	9.72E-01
N6-Acetyl-L-lysine	728	Positif	C8H16N2O3	189/1234	12.03	692-04-6	HMDB00206	17752	5.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
D-Pyrroglutamic-acid	352	Positif	C5H7NO3	130/0499	11.85	4042-36-8	HMDB00805	16010	5.92E-01	9.21E-01	9.97E-01
Carnitine	92	Positif	C7H15NO3	162/1125	12.58	541-15-1	HMDB00062	11060	5.94E-01	9.21E-01	9.97E-01
Prostaglandin-A1 / Prostaglandin-B1-1	605 / 607	Négatif	C20H32O4	335/2228	1.53	14152-28-4 / 13345-51-2	HMDB02656 / HMDB02982	15545 / 27624	6.51E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetylglycine3	308	Négatif	C4H7NO3	116/0353	9.94	543-24-8	HMDB00532	40410	6.53E-01	9.03E-01	9.72E-01
Xanthine1	123	Négatif	C5H4N4O2	151/0262	11.43	69-89-6	HMDB00292	17712	6.53E-01	9.03E-01	9.72E-01
N6-Acetyl-L-lysine1	728	Négatif	C8H16N2O3	187/1088	12.02	692-04-6	HMDB00206	17752	6.53E-01	9.03E-01	9.72E-01
Indoxyl-sulfate	1149	Négatif	C8H7NO4S	212/0023	3.24	487-94-5	HMDB00682	43355	6.53E-01	9.03E-01	9.72E-01
Muramic-acid	565	Négatif	C9H17NO7	250/0932	14.67	1114-41-6	HMDB03254	28118	6.53E-01	9.05E-01	9.72E-01
X4-Amino-nicotinic-acid	1073	Positif	C6H6N2O2	139/0502	8.82	7418-65-7	NA	NA	6.58E-01	9.21E-01	9.97E-01
Imidazolelactic-acid2	283	Négatif	C6H8N2O3...	155/0462	11.76	876-19-7	HMDB02320	27487	6.86E-01	9.03E-01	9.72E-01
Sebacic-acid	13	Négatif	C10H18O4	201/1132	11.47	111-20-6	HMDB00792	41865	7.08E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Ala-D-Ala	470	Positif	C6H12N2O3	161/0921	12.44	923-16-0	HMDB03459	16576	7.14E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetylglycine2	308	Négatif	C4H7NO3	116/0353	9.35	543-24-8	HMDB00532	40410	7.48E-01	9.62E-01	9.72E-01
Argininosuccinic-acid1	687	Négatif	C10H18N4O6	289/1154	16.44	2387-71-5	HMDB00052	15682	7.48E-01	9.03E-01	9.72E-01
DL-alpha-Hydroxystearic-acid	1220	Négatif	C18H36O3	299/2592	1.53	NA	NA	NA	7.48E-01	9.03E-01	9.72E-01
Tartaric-acid	542	Négatif	C4H6O6	149/0092	16.76	87-69-4	HMDB00956	15671	7.65E-01	9.03E-01	9.72E-01
X3-Hydroxybutyric-acid	356	Négatif	C4H8O3	103/0401	9.33	6168-83-8	HMDB00442	17290	7.65E-01	9.03E-01	9.72E-01
O-Acetyl-L-serine / N-Acetyl-DL-serine1	734 / 955	Négatif	C5H9NO4	146/0459	11.08	5147-00-2 / NA	HMDB03011 / HMDB02931	17981 / NA	7.65E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetyl-D-penicillamine	318	Négatif	C7H13NO3S	190/0543	2.26	15537-71-0	NA	61198	7.65E-01	9.27E-01	9.72E-01
X2-Hydroxycinnamic-acid / p-Coumaric-acid	207 / 301	Négatif	C9H8O3	163/0401	8.07	583-17-5 / 4501-31-9	HMDB02641 / HMDB030677	18125 / 1745	7.65E-01	9.03E-01	9.72E-01
Tridecanoic-acid	641	Négatif	C13H26O2	213/186	1.55	638-53-9	HMDB00910	45919	7.65E-01	9.84E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-tyrosine	730	Négatif	C11H13NO4	222/0772	7.91	537-55-3	HMDB00866	21563	7.87E-01	9.07E-01	9.83E-01
Caproic-acid	44	Négatif	C6H12O2	115/0765	2.05	142-62-1	HMDB00535	30776	7.98E-01	9.71E-01	9.72E-01
Methylhippurate	1055	Négatif	C10H11NO3	192/0666	2.11	1205-08-9	HMDB00859	70869	7.99E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetylglycine1	308	Négatif	C4H7NO3	116/0353	11.1	543-24-8	HMDB00532	40410	7.99E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Threonine-acid1	552	Négatif	C4H8O5	135/0299	12.31	734111	HMDB00943	15908	7.99E-01	9.84E-01	9.72E-01
Nicotinamide1	581	Négatif	C6H6N2O	121/0407	2.13	98-92-0	HMDB01406	17154	7.99E-01	9.03E-01	9.72E-01
X5-Aminopyridine-3-carboxylic-acid / 6-Aminopyridine-3-carboxylic-acid	1071 / 1079	Négatif	C6H6N2O2	137/0357	10.47	/ / 24242-19-1 / 3167-49-5	NA / NA	NA / NA	7.99E-01	9.27E-01	9.72E-01

Homovanillic-acid/DL-p-Hydroxyphenylactic-acid	187 / 899	Négatif	C9H10O4	181/0506	8.13	306-08-1/ 306-23-0	HMDB00118/ HMDB00755	545959/ 1739	7.99E-01	9.03E-01	9.72E-01
X5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1b-D-ribofuranosyl-5- monophosphate	653	Négatif	C9H15N4O8P	337/0555	15.57	NA	NA	NA	7.99E-01	9.03E-01	9.72E-01
X2-Hydroxyhexadecanoic-acid	1222	Négatif	C16H32O2	271/2279	1.41	16452-51-0	HMDB831057	65101	7.99E-01	9.05E-01	9.72E-01
Deoxycytidine	145	Positif	C9H13N3O4	228/0979	8.61	951-77-9	HMDB800014	15698	8.33E-01	9.21E-01	9.97E-01
Hypoxanthine	986	Positif	C5H4N4O	137/0458	8.88	68-94-0	HMDB00157	17368	8.33E-01	9.21E-01	9.97E-01
Alpha-D-Amino adipic-acid	113	Positif	C6H11NO4	162/0761	15.36	542-32-5	HMDB00510	37024	8.33E-01	9.38E-01	9.97E-01
Creatine1	694	Négatif	C4H9N3O2	130/0622	13.6	57-00-1	HMDB00064	16919	8.58E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Pyroglutamic-acid1	950	Négatif	C5H7NO3	128/0353	13.99	98-79-3	HMDB00267	18183	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Succinic-acid/Methylmalonic-acid	18 / 225	Négatif	C4H6O4	117/0193	15.55	110-15-6/ 516-05-2	HMDB00254/ HMDB00202	15741 / 3086	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Diglycolic-acid/Malic-acid	1213 / 15	Négatif	C4H6O5	133/0142	16.07	NA / 6915-15- 7	NA / HMDB00744	NA / 6650	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Threonic-acid	552	Négatif	C4H8O5	135/0299	12.8	734111	HMDB00943	15908	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-N-Dimethylglycine	727	Négatif	C4H9NO2	102/056	11.63	1118-68-9	HMDB00092	17724	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
DL-3-Aminoisobutyric-acid / Aminobutyric-acid1	487 / 88	Négatif	C4H9NO2	102/056	14.48	144-90-1/ 56-12-2	HMDB03911/ HMDB00112	27389/ 16865	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Glutamine/D-Glutamine1	24 / 247	Négatif	C5H10N2O3	145/0619	13.99	56-85-9/ 5959-95-5	HMDB00641 / HMDB03423	18050/ 17061	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Pyroglutamic-acid2	352	Négatif	C5H7NO3	128/0353	11.78	4042-36-8	HMDB00805	16010	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-2-Hydroxyglutaric-acid	803	Négatif	C5H8O5	147/0299	15.55	2889-31-8	HMDB00606	32796	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
cis-4-hydroxy-D-proline / trans-4- hydroxy-L-proline/trans-3- Hydroxy-L-proline	96 / 889 / 912	Négatif	C5H9NO3	130/051	15.2	2584-71-6/ 51-35-4 / NA	HMDB60460 / HMDB00725 / HMDB59659	16231 / 18095 / 16889	8.60E-01	9.27E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-alanine1	574	Négatif	C5H9NO3	130/051	8.64	97-69-8	HMDB00766	40992	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
O-Acetyl-L-serine/N-Acetyl-DL- serine2	734 / 955	Négatif	C5H9NO4	146/0459	11.63	5147-00-2/ NA	HMDB03011/ HMDB02931	17981 / NA	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
X3-Hydroxy-3-methylglutaric-acid	676	Négatif	C6H10O5	161/0455	14.79	503-49-1	HMDB00355	16831	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Histidinol	719	Négatif	C6H11N3O	140/0829	10.62	4836-52-6	HMDB03431	16255	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Cystine1	267	Négatif	C6H12N2O4S2	239/0166	15.6	56-89-3	HMDB00192	16283	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
X2-hydroxycaproic-acid	194	Négatif	C6H12O3	131/0713	2.05	6064-63-7	HMDB01624	86542	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Galactonic-acid/Gluconic-acid	1053 / 831	Négatif	C6H12O7	195/051	14.52	13382-27-9/ 526-95-4	HMDB00565/ HMDB00625	16534/ 33198	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
X4-Nitrophenol	399	Négatif	C6H5NO3	138/0197	2.01	100-02-7	HMDB01232	16836	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
X5-Aminopyridine-3-carboxylic- acid / 6-Aminopyridine-3- carboxylic-acid/4-Imidazoleacrylic- acid1	1071 / 1079 / 677	Négatif	C6H6N2O2	137/0357	10.92	// 24242- 19-1 / 3167- 49-5 / 104- 98-3	NA / NA / HMDB00301	NA / NA / 30817	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Nicotinamide-N-oxide	942	Négatif	C6H6N2O2	137/0356	5.26	1986-81-8	HMDB02730	89640	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
para-Methylhippuric-acid/meta- Methylhippuric-acid / Phenylacetyl-glycine/ortho- Methylhippuric-acid	1005 / 1033 / 1054 / 990	Négatif	C10H11NO3	192/0666	3.6	27115-50-0/ 1205-08-9/ 500-98-1/ 42013-20-7	HMDB13292/ HMDB00859/ HMDB00821/ HMDB11723	68552/ 70869/ 27480/ 68455	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
N6-Methyladenine	568	Négatif	C6H7N5	148/0629	3.78	443-72-1	HMDB02099	28871	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Citric-acid/Isocitric-acid	14 / 46	Négatif	C6H8O7	191/0197	17.66	77-92-9/ 320-77-4	HMDB00094 / HMDB00193	30769/ 30887	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-aspartic-acid1	575	Négatif	C6H9NO5	174/0408	15.2	997-55-7	HMDB00812	21547	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Pro-Gly / Gly-Pro1	1016 / 1109	Négatif	C7H12N2O3	171/0775	13.47	2578-57-6/ 704-15-4	HMDB11178 / HMDB00721	NA / 356660	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
mono-Methyl-adipate	315	Négatif	C7H12O4	159/0663	2.05	627-91-8	HMDB59722	70855	8.60E-01	9.86E-01	9.72E-01
N-acetyl-DL-Valine	1108	Négatif	C7H13NO3	158/0823	4	3067-19-4	HMDB11757	NA	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Suberic-acid	16	Négatif	C8H14O4	173/0819	13.39	505-48-6	HMDB00893	9300	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-leucine	316	Négatif	C8H15NO3	172/0979	3.4	1188-21-2	HMDB11756	17786	8.60E-01	9.03E-01	9.83E-01
Glutathione1	130	Négatif	C10H17N3O6S	306/0765	16.85	70-18-8	HMDB00125	16856	8.60E-01	9.62E-01	9.72E-01
X3-Amino-3-4-hydroxyphenyl- propanoic-acid / Tyrosine	1126 / 36	Négatif	C9H11NO3	180/0666	11.86	/ 6049-54-3 / 60-18-4	NA/ HMDB00158	16939/ 17895	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Deoxyuridine / 2-Deoxyuridine	148 / 895	Négatif	C9H12N2O5	227/0673	4.61	951-78-0/ 951-78-0	HMDB00012 / HMDB00012	16450 / 1645	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
beta-Pseudouridine	1138	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	11.68	1445-07-4	HMDB00767	17802	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Uridine	998	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	7.74	58-96-8	HMDB00296	16704	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Azelaic-acid	295	Négatif	C9H16O4	187/0976	12.45	123-99-9	HMDB00784	48131	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Capryloylglycine	1199	Négatif	C10H19NO3	200/1292	1.89	14246-53-8	HMDB00832	74099	8.60E-01	9.71E-01	9.72E-01
X10-hydroxydecanoic-acid/3- hydroxydecanoic-acid	193 / 192	Négatif	C10H20O3	187/134	2.05	// 1679-53-4 // 14292-26- 3	NA / HMDB02203	17409 / 37371	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
X5-Hydroxyindoleacetic-acid	239	Négatif	C10H9NO3	190/0509	12.27	54-16-0	HMDB00763	27823	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
X2-Methylguanosine / 2-O- Methylguanosine1	1044 / 112	Négatif	C11H15N5O5	296/1	9.19	2140-77-4/ 2140-77-4	HMDB05862/ HMDB05862	19702/ 19702	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetylneuraminic-acid1	801	Négatif	C11H19NO9	308/0987	13.91	131-48-6	HMDB00230	45744	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Deoxyinosine	146	Négatif	C10H12N4O4	251/0786	8.43	890-38-0	HMDB00071	28997	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Aspartylglycosamine1	578	Négatif	C12H21N3O8	334/1256	14.96	2776-93-4	HMDB00489	17261	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Sucrose	64	Négatif	C12H22O11	341/1089	14.48	57-50-1	HMDB00258	17992	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
S-Adenosyl-homocysteine1	126	Négatif	C14H20N6O5S	383/1143	12.61	979-92-0	HMDB00939	16680	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Cytidine-5-diphosphocholine1	463	Négatif	C14H26N4O11P2	487/1001	15.68	987-78-0	HMDB01413	16436	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Uridine-5-diphosphogalactose	644	Négatif	C15H24N2O17P2	565/0477	16.95	2956-16-3	HMDB00302	67119	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Chlorogenic-acid	39	Négatif	C16H18O9	353/0878	12.69	327-97-9	HMDB03164	16112	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Guanosine-5-diphospho-D- mannose / Guanosine-5- diphosphoglucose1	710 / 711	Négatif	C16H25N5O16P2	604/0699	17.89	3123-67-9 / NA	HMDB01163 / NA	15820 / NA	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Prostaglandin-A2 / Prostaglandin- B2-1	606 / 608	Négatif	C20H30O4	333/2071	1.8	13345-50-1/ 13367-85-6	HMDB02752 / HMDB04236	27820 / 28099	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Xanthosine	275	Négatif	C10H12N4O6	283/0684	12.11	146-80-5	HMDB00299	18107	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Phosphoenolpyruvic-acid21	254	Négatif	C3H5O6P	166/9751	16.84	138-08-9	HMDB00263	44897	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Sarcosine1	168	Négatif	C3H7NO2	88/0404	13.6	107-97-1	HMDB00271	15611	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Alanine / Alanine1	29 / 339	Négatif	C3H7NO2	88/0404	14.32	56-41-7 / 107-95-9	HMDB00161 / HMDB00056	16977 / 16958	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Alanine / Alanine	29 / 339	Négatif	C3H7NO2	88/0404	15.22	56-41-7 / 107-95-9	HMDB00161 / HMDB00056	16977 / 16958	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Cysteine	26	Négatif	C3H7NO2S	120/0125	15.66	52-90-4	HMDB00574	17561	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Fumaric-acid/Maleic-acid	12 / 556	Négatif	C4H4O4	115/0037	16.07	110-17-8/ 110-16-7	HMDB00134 / HMDB00176	18012 / 183	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
X1-Methylhydantoin / Dihydrouracil	363 / 893	Négatif	C4H6N2O2	113/0356	2.93	616-04-6/ 504-07-4	HMDB03646 / HMDB00076	16354 / 15901	8.60E-01	9.03E-01	9.72E-01
Succinic-acid	18	Négatif	C4H6O4	117/0193	16.5	110-15-6	HMDB00254	15741	8.71E-01	9.82E-01	9.72E-01
L-Citrulline1	91	Négatif	C6H13N3O3	174/0884	14.57	372-75-8	HMDB00904	16349	8.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Myristic-acid	725	Négatif	C14H28O2	227/2017	1.49	544-63-8	HMDB00806	28875	8.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Allantoin	426	Négatif	C4H6N4O3	157/0367	12.61	97-59-6	HMDB00462	15676	8.96E-01	9.03E-01	9.72E-01

N-acetyl-DL-norvaline / N-Isovaleroylglycine	1096 / 1111	Négatif	C7H13NO3	158/0823	4.1	50-282-947/ 16284-60-9	NA / HMDB00678	NA / NA	8.96E-01	9.03E-01	9.72E-01
X6-Methylnicotinamide/N-Methylnicotinamide/2-Methylnicotinamide1	1103 / 1112/ 1144	Négatif	C7H8N2O	135/0564	1.91	6960-22-1/ 114-33-0/ 114-33-0	HMDB13704 / HMDB03152 / HMDB03152	88954 / 64399 / 64399	8.96E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-alanine	574	Positif	C5H9NO3	132/0655	9.6	97-69-8	HMDB00766	40992	8.99E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetyl-L-methionine	904	Positif	C7H13NO3S	192/0689	4.12	65-82-7	HMDB11745	21557	9.17E-01	9.21E-01	9.97E-01
Argininosuccinic-acid	687	Positif	C10H18N4O6	291/1299	16.45	2387-71-5	HMDB00052	15682	9.17E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetyl-Asp-Glu	570	Positif	C11H16N2O8	305/0979	16.94	NA	NA	NA	9.17E-01	9.21E-01	9.97E-01
D-Pyroglutamic-acid1	352	Négatif	C5H7NO3	128/0353	10.6	4042-36-8	HMDB00805	16010	9.18E-01	9.03E-01	9.72E-01
DL-Tryptophan/L-Tryptophan1	289 / 292	Négatif	C11H12N2O2	203/0826	10	54-12-6 / 73- 22-3	HMDB03096 / HMDB00929	27897 / 16828	9.18E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Mannitol-1-phosphate	489	Négatif	C6H15O9P	261/0381	15.6	15806-48-1	HMDB01530	16298	9.25E-01	9.75E-01	9.72E-01
trans-Aconitic-acid / cis-Aconitic-acid	305 / 45	Négatif	C6H6O6	173/0092	17.62	4023-65-8 / 585-84-2	HMDB00958 / HMDB00072	32806 / 32805	9.30E-01	9.03E-01	9.72E-01
X11-12-Epoxy-5Z-8Z-14Z-eicosatrienoic-acid / 8S-Hydroxy-5Z-9E-11Z-14Z-eicosatetraenoic-acid	359 / 662	Négatif	C20H32O3	319/2279	1.45	81276-02-0/ 98462-03-4	HMDB04673 / HMDB04679	NA / 34486	9.30E-01	9.03E-01	9.72E-01
Methylmalonic-acid	225	Négatif	C4H6O4	117/0193	16.45	516-05-2	HMDB00202	30860	9.47E-01	9.46E-01	9.72E-01
N-Acetyl-D-allo-isoleucine	948	Négatif	C8H15NO3	172/0979	3.62	54831-20-8	HMDB16184	NA	9.53E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Glycolylneuraminic-acid	580	Négatif	C11H19NO10	324/0936	14.83	1113-83-3	HMDB00833	62084	9.63E-01	9.31E-01	9.72E-01
Pyroole-2-carboxylic-acid	329	Négatif	C5H5NO2	110/0247	7.76	634-97-9	HMDB04230	36751	9.68E-01	9.03E-01	9.72E-01
Biotin1	62	Négatif	C10H16N2O3S	243/0809	10.24	58-85-5	HMDB00030	15956	9.68E-01	9.03E-01	9.72E-01
Nicotinamide2	581	Négatif	C6H6N2O	121/0407	2.93	98-92-0	HMDB01406	17154	9.68E-01	9.03E-01	9.72E-01
Triethanolamine	817	Positif	C6H15NO3	150/1125	3.63	102-71-6	HMDB32538	28621	9.75E-01	9.38E-01	9.97E-01
Galactose-1-phosphate/Mannose-1-phosphate/D-Mannose-6-phosphate/D-Fructose-6-phosphate	1186 / 416/ 490 / 700	Négatif	C6H13O9P	259/0224	15.49	2255-14-3 / 27251-84-9 / 3672-15-9 / 643-13-0	HMDB00645 / HMDB06330 / HMDB01078 / HMDB00124	17973 / 35374 / 49728 / 15946	9.76E-01	9.03E-01	9.72E-01
X3-5-Dihydroxy-phenylglycine	979	Négatif	C8H9NO4	182/0459	14.92	162870-29-3 /	NA	NA	9.76E-01	9.96E-01	9.83E-01
Glycerol-3-phosphate2	1086	Négatif	C3H9O6P	171/0064	15.39	57-03-4	HMDB00126	15978	9.76E-01	9.46E-01	9.72E-01
dGMP / 5-AMP	175 / 972	Négatif	C10H14N5O7P	346/0558	15.37	902-04-5 / 61-19-8	HMDB01044 / HMDB00045	16192 / 16027	9.80E-01	9.75E-01	9.72E-01
L-Anserine1	544	Négatif	C10H16N4O3	239/1115	13.1	584-85-0	HMDB00194	18323	9.80E-01	9.03E-01	9.72E-01
Deoxycytidine1	145	Négatif	C9H13N3O4	226/0833	8.5	951-77-9	HMDB00014	15698	9.80E-01	9.03E-01	9.72E-01
Cytidine1	10	Négatif	C9H13N3O5	242/0783	10.24	65-46-3	HMDB00089	17562	9.80E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Pyroglutamic-acid3	950	Positif	C5H7NO3	130/0499	14	98-79-3	HMDB00267	18183	9.85E-01	9.32E-01	9.97E-01
X2-Aminopyridine-3-carboxylic-acid/Nicotinamide-N-oxide	1077 / 942	Positif	C6H6N2O2	139/0502	5.39	5345-47-1 / 1986-81-8	HMDB61680 / HMDB02730	68572 / 8964	9.85E-01	9.21E-01	9.97E-01
Methylimidazoleacetic-acid	224	Positif	C6H8N2O2	141/0659	9.06	2625-49-2	HMDB02820	1606	9.85E-01	9.21E-01	9.97E-01
L-Alanyl-L-proline	946	Positif	C8H14N2O3	187/1077	9.97	NA	HMDB28695	NA	9.85E-01	9.21E-01	9.97E-01
UDP	171	Positif	C9H14N2O12P2	405/0095	16.98	58-98-0	HMDB00295	17659	9.85E-01	9.21E-01	9.97E-01
N6-N6-N6-Trimethyl-L-lysine	726	Positif	C9H20N2O2	189/1598	16.02	19253-88-4	HMDB01325	17311	9.85E-01	9.21E-01	9.97E-01
Cytidine-5-diphosphocholine	463	Positif	C14H26N4O11P2	489/1146	15.69	987-78-0	HMDB01413	16436	9.85E-01	9.21E-01	9.97E-01
Guanosine-5-diphospho-D-mannose/Guanosine-5-diphosphoglucose	710 / 711	Positif	C16H25N5O16P2	606/0844	17.9	3123-67-9 / NA	HMDB01163 / NA	15820 / NA	9.85E-01	9.21E-01	9.97E-01
Prostaglandin-A2/Prostaglandin-B2	606 / 608	Positif	C20H30O4	335/2217	1.81	13345-50-1 / 13367-85-6	HMDB02752 / HMDB04236	27820 / 28099	9.85E-01	9.38E-01	9.97E-01
L-Glutamine/D-Glutamine	24 / 247	Positif	C5H10N2O3	147/0764	14	56-85-9 / 5959-95-5	HMDB00641 / HMDB03423	18050 / 17061	9.85E-01	9.38E-01	9.97E-01
L-Citrulline	91	Positif	C6H13N3O3	176/103	14.65	372-75-8	HMDB00904	16349	9.85E-01	9.38E-01	9.97E-01
Adenosine1	6	Négatif	C10H13N5O4	266/0895	6.08	58-61-7	HMDB00050	16335	9.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Gly-Gly / Asparagine2	1089 / 33	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	14.52	556-50-3 / 70-47-3	HMDB11733 / HMDB00168	17201 / 17196	9.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Adenine1	111	Négatif	C5H5N5	134/0472	6.06	73-24-5	HMDB00034	16708	9.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Histidine2	22	Négatif	C6H9N3O2	154/0622	14.32	71-00-1	HMDB00177	15971	9.88E-01	9.03E-01	9.83E-01
D-Sedoheptulose-7-phosphate	1182	Négatif	C7H15O10P	289/033	16.29	2646-35-7	HMDB01068	15721	9.88E-01	9.71E-01	9.72E-01
N-Acetyl-D-glucosamine-1-phosphate/N-Acetyl-D-glucosamine-6-phosphate	569 / 573	Négatif	C8H16NO9P	300/049	15.39	901851-43-2 / 102029-88-9	HMDB01367 / HMDB01062	7125 / 15783999999	9.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Capric-acid	45	Négatif	C10H20O2	171/1391	1.66	334-48-5	HMDB00511	30813	9.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Elaidic-acid/trans-Vaccenic-acid	498 / 64	Négatif	C18H34O2	281/2486	1.41	112-79-8 / 693-72-1	HMDB00573 / HMDB03231	27997 / 50464	9.88E-01	9.31E-01	9.72E-01
Oxalic-acid	591	Négatif	C2H2O4	88/988	17.01	144-62-7	HMDB02329	16995	9.88E-01	9.03E-01	9.72E-01
Nicotine1	910	Positif	C10H14N2	163/123	1.83	54-11-5	HMDB14330	NA	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
X1-Methylhistidine	41	Positif	C7H11N3O2	170/0924	11.34	332-80-9	HMDB00001	50599	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
Pro-Gly / Gly-Pro	1016 / 1109	Positif	C7H12N2O3	173/0921	13.32	2578-57-6 / 704-15-4	HMDB11178 / HMDB00721	NA / 356660	9.90E-01	9.65E-01	9.97E-01
X2-Aminobenzoic-acid / Trigonelline	132 / 748	Positif	C7H7NO2	138/055	10.21	118-92-3 / 535-83-1	HMDB01123 / HMDB00875	30754 / 18123	9.90E-01	9.38E-01	9.97E-01
X6-Methylnicotinamide / N-Methylnicotinamide/2-Methylnicotinamide	1103 / 1112/ 1144	Positif	C7H8N2O	137/0709	1.9	6960-22-1 / 114-33-0 / 114-33-0	HMDB13704 / HMDB03152 / HMDB03152	88954 / 64399 / 64399	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
Tyrosine	36	Positif	C9H11NO3	182/0812	11.79	60-18-4	HMDB00158	17895	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
L-Anserine	544	Positif	C10H16N4O3	241/1295	13.11	584-85-0	HMDB00194	18323	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetylneuraminic-acid	801	Positif	C11H19NO9	310/1133	13.91	131-48-6	HMDB00230	45744	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
S-Adenosyl-homocysteine	126	Positif	C14H20N6O5S	385/1289	12.68	979-92-0	HMDB00939	16680	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
Riboflavin	74	Positif	C17H20N4O6	377/1456	6.4	83-88-5	HMDB00244	17015	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
D-Sphingosine	496	Positif	C18H37NO2	300/2897	1.71	NA	NA	NA	9.90E-01	9.32E-01	9.97E-01
Creatine	694	Positif	C4H9N3O2	132/0768	13.61	57-00-1	HMDB00064	16919	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
Methionine-sulfoxide	298	Positif	C5H11O3NS	166/0533	12.97	62697-73-8	HMDB02005	49033	9.90E-01	9.38E-01	9.97E-01
Xanthine	123	Positif	C5H4N4O2	153/0407	12.14	69-89-6	HMDB00292	17712	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
Nicotine	665	Positif	C10H14N2	163/123	1.83	54-11-5	HMDB01934	17688	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
L-Cystine	267	Positif	C6H12N2O4S2	241/0312	15.65	56-89-3	HMDB00192	16283	9.90E-01	9.21E-01	9.97E-01
L-Pyroglutamic-acid4	950	Positif	C5H7NO3	130/0499	15.3	98-79-3	HMDB00267	18183	9.93E-01	9.51E-01	9.97E-01
ADP	178	Positif	C10H15N5O10P2	428/0367	15.58	58-64-0	HMDB01341	16761	9.93E-01	9.68E-01	9.97E-01
X1-methyl-guanine / 7-methylguanine	121 / 7	Positif	C6H7N5O	166/0723	7.36	938-85-2 / 578-76-7	HMDB03282 / HMDB00897	21803 / 28664	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
X7-methylguanine	7	Positif	C6H7N5O	166/0723	8.1	578-76-7	HMDB00897	28664	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
X3-Aminophenol/2-Aminophenol	1046 / 1047	Positif	C6H7NO	110/06	3.04	591-27-5 / 95-55-6	NA / NA	NA / NA	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
Imidazolelactic-acid	283	Positif	C6H8N2O3...	157/0608	11.11	876-19-7	HMDB02320	27487	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
Histidine	22	Positif	C6H9N3O2	156/0768	13.32	71-00-1	HMDB00177	15971	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetyl-L-aspartic-acid	575	Positif	C6H9NO5	176/0553	15.17	997-55-7	HMDB00812	21547	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
GDP	184	Positif	C10H15N5O11P2	444/0316	17.67	146-91-8	HMDB01201	17552	9.93E-01	9.51E-01	9.97E-01
L-Histidine-methyl-ester	1069	Positif	C7H11N3O2	170/0924	3.63	7389-87-9	NA	NA	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01

N-Tiglylglycine / 3-Methylcrotonylglycine	1136 / 1137	Positif	C7H11NO3	158/0812	3.73	35842-45-6 / 33008-07-0	HMDB00959 / HMDB00459	73018 / 68499	9.93E-01	9.32E-01	9.97E-01
N-Acetyl-L-glutamic-acid/N-acetyl-DL-glutamic-acid	576 / 898	Positif	C7H11NO5	190/071	14.9	1188-37-0 / 1188-37-0	HMDB01138 / HMDB01138	12575 / 12575	9.93E-01	9.70E-01	9.97E-01
N-acetyl-L-glutamine	890	Positif	C7H12N2O4	189/087	11.15	2490-97-3	HMDB06029	73685	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Cystathionine/L-Cystathionine	127 / 259	Positif	C7H14N2O4S	223/0747	15.85	535-34-2 / 56-88-2	HMDB00455 / HMDB00099	NA / 17482	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Biotin	62	Positif	C10H16N2O3S	245/0955	10.25	58-85-5	HMDB00030	15956	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Pyridoxamine-5-phosphate	614	Positif	C8H13N2O5P	249/0635	15.61	529-96-4	HMDB01555	18335	9.93E-01	9.68E-01	9.97E-01
Phenylalanine	27	Positif	C9H11NO2	166/0863	8.18	63-91-2	HMDB00159	17295	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Cytidine	10	Positif	C9H13N3O5	244/0928	10.25	65-46-3	HMDB00089	17562	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
X7-8-Dihydro-L-biopterin	409	Positif	C9H13N5O3	240/1091	11.15	6779-87-9	HMDB00038	64277	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
UDP2	171	Positif	C9H14N2O12P2	405/0095	16.16	58-98-0	HMDB00295	17659	9.93E-01	9.32E-01	9.97E-01
Carnosine	277	Positif	C9H14N4O3	227/1139	14.27	305-84-0	HMDB00033	15727	9.93E-01	9.68E-01	9.97E-01
Acetyl-L-carnitin	86	Positif	C9H17NO4	204/1123	10.01	3040-38-8	HMDB00201	73024	9.93E-01	9.86E-01	9.97E-01
dGTP / ATP	182 / 55	Positif	C10H16N5O13P3	508/003	16.41	2564-35-4 / 56-65-5	HMDB01440 / HMDB00538	16497 / 15422	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
dGTP	182	Positif	C10H16N5O13P3	508/003	17.63	2564-35-4	HMDB01440	16497	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
GTP	153	Positif	C10H16N5O14P3	523/9979	18.45	86-01-1	HMDB01273	15996	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Glutathione	130	Positif	C10H17N3O6S	308/0911	18.43	70-18-8	HMDB00125	16856	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Propionylcarnitine	1117	Positif	C10H19NO4	218/1387	8.51	17298-37-2	HMDB00824	28867	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Inosine4	54	Positif	C10H12N4O5	269/0881	10.44	58-63-9	HMDB00195	17596	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
DL-Tryptophan/L-Tryptophan	289 / 292	Positif	C11H12N2O2	205/0972	9.97	54-12-6 / 73-22-3	HMDB03096 / HMDB00929	27897 / 16828	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
X2-O-Methyladenosine	384	Positif	C11H15N5O4	282/1197	3.65	2140-79-6	HMDB04326	119928	9.93E-01	9.51E-01	9.97E-01
X1-Methyladenosine	237	Positif	C11H15N5O4	282/1197	8.28	15763-06-1	HMDB03331	16020	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
X7-Methylguanosine	1043	Positif	C11H15N5O5	298/1146	11.46	20244-86-4	HMDB01107	20794	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
X2-O-Methylguanosine	1120	Positif	C11H15N5O5	298/1146	8.04	2140-77-4	HMDB05862	19702	9.93E-01	9.32E-01	9.97E-01
X2-Methylguanosine/2-O-Methylguanosine	1044 / 112	Positif	C11H15N5O5	298/1146	9.26	2140-77-4 / 2140-77-4	HMDB05862 / HMDB05862	19702 / 19702	9.93E-01	9.65E-01	9.98E-01
N-Acetyl-L-carnosine	1121	Positif	C11H16N4O4	269/1244	10.63	56353-15-2	HMDB12881	67249	9.93E-01	9.38E-01	9.97E-01
Inosine	54	Positif	C10H12N4O5	269/0881	11.25	58-63-9	HMDB00195	17596	9.93E-01	9.51E-01	9.97E-01
Leu-Pro	1061	Positif	C11H20N2O3	229/1547	3.61	87178-63-0	HMDB11175	NA	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Pro-Leu	1060	Positif	C11H20N2O3	229/1547	8.94	52899-07-7	NA	NA	9.93E-01	9.32E-01	9.97E-01
Butyryl-carnitine	1134	Positif	C11H21NO4	232/1543	7.34	25576-40-3	HMDB02013	7676	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Aspartylglycosamine	578	Positif	C12H21N3O8	336/1401	14.97	2776-93-4	HMDB00489	17261	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Tryptotropin-releasing-hormone	747	Positif	C16H22N6O4	363/1775	7.98	NA	HMDB60080	NA	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Inosine-5-monophosphate	530	Positif	C10H13N4O8P	349/0544	16.55	131-99-7	HMDB00175	17202	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
UDP-N-acetylglucosamine	1164	Positif	C17H27N3O17P2	608/0889	16.2	528-04-1	HMDB00290	16264	9.93E-01	9.51E-01	9.97E-01
L-Glutathione-oxidized	811	Positif	C20H32N6O12S2	613/1592	17.53	27025-41-8	HMDB03337	17858	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Prostaglandin-A1/Prostaglandin-B1	605 / 607	Positif	C20H32O4	337/2373	2.02	14152-28-4 / 13345-51-2	HMDB02656 / HMDB02982	15545 / 27624	9.93E-01	9.68E-01	9.97E-01
NAD	32	Positif	C21H27N7O14P2	664/1164	14.76	53-84-9	HMDB00902	15846	9.93E-01	9.85E-01	9.97E-01
Taurine	59	Positif	C2H7NO3S	126/0219	14.1	107-35-7	HMDB000251	15891	9.93E-01	9.32E-01	9.97E-01
O-Phosphorylethanolamine	735	Positif	C2H8NO4P	142/0264	15.81	1071-23-4	HMDB00224	17553	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Sarcosine	168	Positif	C3H7NO2	90/055	13.59	107-97-1	HMDB00271	15611	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Adenosine	6	Positif	C10H13N5O4	268/104	6.07	58-61-7	HMDB00050	16335	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Glycerol-3-phosphate	1086	Positif	C3H9O6P	173/021	15.4	57-03-4	HMDB00126	15978	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
Cytosine	142	Positif	C4H5N3O	112/0505	8.59	71-30-7	HMDB00630	16040	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
Creatinine	997	Positif	C4H7N3O	114/0662	6.6	60-27-5	HMDB00562	16737	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetylglucosamine	208	Positif	C4H7NO3	118/0499	10.52	543-24-8	HMDB00532	40410	9.93E-01	9.48E-01	9.97E-01
L-Aspartic-acid	266	Positif	C4H7NO4	134/0448	15.21	56-84-8	HMDB00191	17053	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Gly-Gly / Asparagine	1089 / 33	Positif	C4H8N2O3	133/0608	13.98	556-50-3 / 70-47-3	HMDB11733 / HMDB00168	17201 / 17196	9.93E-01	9.32E-01	9.97E-01
DL-3-Aminoisobutyric-acid / Aminobutyric-acid	487 / 88	Positif	C4H9NO2	104/0706	14.49	144-90-1 / 56-12-2	HMDB03911 / HMDB00112	27389 / 16865	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Guanosine	5	Positif	C10H13N5O5	284/099	11.52	118-00-3	HMDB00133	16750	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
X4-Guanidinobutyric-acid	276	Positif	C5H11N3O2	146/0924	13.98	463-00-3	HMDB03464	15728	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Valine / Betaine	30 / 439	Positif	C5H11NO2	118/0863	11.01	72-18-4 / 107-43-7	HMDB00883 / HMDB00043	16414 / 1775	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Betaine	439	Positif	C5H11NO2	118/0863	9.65	107-43-7	HMDB00043	17750	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
D-Penicillamine/5-ethyl-L-cysteine / Methionine	1065 / 1095 / 28	Positif	C5H11NO2S	150/0583	9.79	52-67-5 / 2629-59-6 / 63-68-3	HMDB14997 / NA / HMDB00696	50868 / NA / 16643	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
D-Ribulose-5-phosphate	425	Positif	C5H11O8P	231/0264	15.87	4151-19-3	HMDB00618	17797	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Xanthine2	193	Positif	C5H4N4O2	153/0407	11.42	69-89-6	HMDB00292	17712	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Adenine	111	Positif	C5H5N5	136/0618	6.23	73-24-5	HMDB00034	16708	9.93E-01	9.32E-01	9.97E-01
Guanine	1102	Positif	C5H5N5O	152/0567	11.52	73-40-5	HMDB00132	16235	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
D-Pyroglutamic-acid3	352	Positif	C5H7NO3	130/0499	10.59	4042-36-8	HMDB00805	16010	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
D-Pyroglutamic-acid4	352	Positif	C5H7NO3	130/0499	11.15	4042-36-8	HMDB00805	16010	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Proline	21	Positif	C5H9NO2	116/0706	11.69	147-85-3	HMDB00162	17203	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetyl-DL-serine	955	Positif	C5H9NO4	148/0604	11.09	NA	HMDB02931	NA	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
X3-AMP / 5-AMP	176 / 972	Positif	C10H14N5O7P	348/0704	14.52	84-21-9 / 61-19-8	HMDB03540 / HMDB00045	28931 / 16027	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
L-Glutamic-acid2	222	Positif	C5H9NO4	148/0605	15.3	56-86-0	HMDB00148	16015	9.93E-01	9.51E-01	9.97E-01
L-Glutamic-acid	222	Positif	C5H9NO4	148/0605	15.89	56-86-0	HMDB00148	16015	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
N-Acetyl-L-asparagine	887	Positif	C6H10N2O4	175/0713	12.34	4033-40-3	HMDB06028	NA	9.93E-01	9.65E-01	9.97E-01
Methylhistamine	1100	Positif	C6H11N3	126/1026	10.65	501-75-7	HMDB00898	29009	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
L-Norleucine / Leucine	1003 / 34	Positif	C6H13NO2	132/1019	9.14	327-57-1 / 61-90-5	HMDB01645 / HMDB00687	18347 / 15603	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
GMP	185	Positif	C10H14N5O8P	364/0653	16.84	85-32-5	HMDB01397	17345	9.93E-01	9.85E-01	9.97E-01
L-Norleucine / DL-Leucine / Isoleucine / Leucine	1003 / 216 / 25 / 34	Positif	C6H13NO2	132/1019	9.65	327-57-1 / 5699-54-7 / 73-32-5 / 61-90-5	HMDB01645 / HMDB03640 / HMDB00172 / HMDB00687	18347 / 15604 / 17191 / 15603	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Mannose-1-phosphate / D-Fructose-1-phosphate / D-Mannose-6-phosphate	1186 / 281 / 416 / 477 / 490	Positif	C6H13O9P	261/037	16.61	2255-14-3 / 59-56-3 / 27251-84-9 / 15978-08-2 / 3672-15-9	HMDB00645 / HMDB01586 / HMDB06330 / HMDB01076 / HMDB01078	17973 / 16077 / 35374 / 704854 / 49728	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Mannose-1-phosphate / D-Fructose-1-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / Glucose-6-P04	1186 / 281 / 416 / 477 / 490 / 65	Positif	C6H13O9P	261/037	16.92	2255-14-3 / 59-56-3 / 27251-84-9 / 15978-08-2 / 3672-15-9 / 56-73-5	HMDB00645 / HMDB01586 / HMDB06330 / HMDB01076 / HMDB01078 / HMDB01401	17973 / 16077 / 35374 / 704854 / 49728 / 4170	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Arginine2	35	Positif	C6H14N4O2	175/119	17.03	74-79-3	HMDB00517	16467	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
Arginine	35	Positif	C6H14N4O2	175/119	17.73	74-79-3	HMDB00517	16467	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
D-Glucosamine-6-phosphate	701	Positif	C6H14NO8P	260/053	15.95	3616-42-0	HMDB01254	15873	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01



Nicotinamide	581	Positif	C6H6N2O	123/0553	2.93	98-92-0	HMD801406	17154	9.93E-01	9.21E-01	9.97E-01
X5-Aminopyridine-3-carboxylic-acid / 6-Aminopyridine-3-carboxylic-acid/4-Imidazoleacrylic-acid	1071 / 1079 / 677	Positif	C6H6N2O2	139/0502	10.93	// 24242-19-1 / 3167-49-5 / 104-98-3	NA / NA / HMD800301	NA / NA / 30817	9.93E-01	9.38E-01	9.97E-01
Aminobutyric-acid	88	Négatif	C4H9NO2	102/0561	15.29	56-12-2	HMD800112	16865	9.93E-01	9.05E-01	9.72E-01
Orotic-acid	227	Négatif	C5H4N2O4	155/0098	9.84	65-86-1	HMD800226	16742	9.93E-01	9.35E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-asparagine1	887	Négatif	C6H10N2O4	173/0568	11.76	4033-40-3	HMD806028	NA	9.93E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Saccharic-acid	1142	Négatif	C6H10O8	209/0303	17.07	25525-21-7	HMD800663	16002	9.93E-01	9.03E-01	9.72E-01
X3-Methylhistidine / Methyl-DL-histidine	1013 / 1072	Négatif	C7H11N3O2	168/0778	13.12	368-16-1 / NA	HMD800479 / NA	27596 / NA	9.93E-01	9.03E-01	9.72E-01
Carnosine1	277	Négatif	C9H14N4O3	225/0993	14.34	305-84-0	HMD800033	15727	9.93E-01	9.82E-01	9.72E-01
Arachidic-acid	686	Négatif	C20H40O2	311/2956	1.35	506-30-9	HMD802212	28822	9.93E-01	9.05E-01	9.72E-01
L-Pyroglutamic-acid2	950	Négatif	C5H7NO3	128/0353	15.31	98-79-3	HMD800267	18183	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Inosine-5-monophosphate1	530	Négatif	C10H13N4O8P	347/0398	16.52	131-99-7	HMD800175	17202	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Erythrono-1-4-lactone1	975	Négatif	C4H6O4	117/0193	15.48	17675-99-9	HMD800349	290972	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Creatinine1	997	Négatif	C4H7N3O	112/0516	6.55	60-27-5	HMD800562	16737	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Aspartic-acid1	266	Négatif	C4H7NO4	132/0302	15.27	56-84-8	HMD800191	17053	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Gly-Gly / Asparagine1	1089 / 33	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	13.97	556-50-3 / 70-47-3	HMD811733 / HMD800168	17201 / 17196	9.94E-01	9.03E-01	9.83E-01
D-Arabinose	325	Négatif	C5H10O5	149/0455	12.09	147-81-9	HMD829942	46983	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Thymidine	9	Négatif	C10H14N2O5	241/083	3.07	50-89-5	HMD800273	17748	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Ribose-5-phosphate / D-Ribose-1-phosphate / D-Ribulose-5-phosphate / D-Xylulose-5-phosphate1	152 / 494 / 495 / 497	Négatif	C5H11O8P	229/0119	15.41	3615-55-2 / 14075-00-4 / 4151-19-3 / 4212-65-1	HMD801548 / HMD801489 / HMD800618 / HMD800868	52742 / 16300 / 17797 / 16332	9.94E-01	9.46E-01	9.72E-01
D-Ribose-5-phosphate / D-Ribose-1-phosphate / D-Ribulose-5-phosphate / D-Xylulose-5-phosphate	152 / 494 / 495 / 497	Négatif	C5H11O8P	229/0119	15.96	3615-55-2 / 14075-00-4 / 4151-19-3 / 4212-65-1	HMD801548 / HMD801489 / HMD800618 / HMD800868	52742 / 16300 / 17797 / 16332	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Ornithine	163	Négatif	C5H12N2O2	131/0826	17.15	70-26-8	HMD800214	15729	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Uric-acid	274	Négatif	C5H4N4O3	167/021	12.53	69-93-2	HMD800289	17775	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
X3-AMP / 5-AMP1	176 / 972	Négatif	C10H14N5O7P	346/0558	14.52	84-21-9 / 61-19-8	HMD803540 / HMD800045	28931 / 16027	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Guanine1	1102	Négatif	C5H5N5O	150/0421	11.53	73-40-5	HMD800132	16235	9.94E-01	9.31E-01	9.83E-01
Imidazoleacetic-acid	219	Négatif	C5H6N2O2	125/0356	11.72	645-65-8	HMD802024	16974	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Thymine	1059	Négatif	C5H6N2O2	125/0357	2.95	65-71-4	HMD800262	17821	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Proline1	21	Négatif	C5H9NO2	114/0561	11.7	147-85-3	HMD800162	17203	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Glutamic-acid1	222	Négatif	C5H9NO4	146/0459	15.31	56-86-0	HMD800148	16015	9.94E-01	9.07E-01	9.72E-01
GMP1	185	Négatif	C10H14N5O8P	362/0507	16.84	85-32-5	HMD801397	17345	9.94E-01	9.84E-01	9.72E-01
Adipic-acid / 2,2-Dimethylsuccinic-acid / 2-Methylglutaric-acid / 3-Methylglutaric-acid	17 / 894 / 965 / 987	Négatif	C6H10O4	145/0506	14.83	124-04-9 / 597-43-3 / 617-62-9 / 626-51-7	HMD800448 / HMD802074 / HMD800422 / HMD800752	30832 / 86537 / 68567 / 68566	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
X4-Acetamidobutanoic-acid	1051	Négatif	C6H11NO3	144/0666	9.15	3025-96-5	HMD803681	17645	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Formyl-L-methionine	579	Négatif	C6H11NO3S	176/0387	4.69	4289-98-9	HMD801015	16552	9.94E-01	9.62E-01	9.72E-01
ADP1	178	Négatif	C10H15N5O10P2	426/0221	15.57	58-64-0	HMD801341	16761	9.94E-01	9.35E-01	9.72E-01
X2-hydroxycaproic-acid / 2-hydroxycaproic-acid	194 / 194	Négatif	C6H12O3	131/0713	2.71	6064-63-7 / 6064-63-7	HMD801624 / HMD801624	86542 / 86542	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Gluconic-acid	831	Négatif	C6H12O7	195/051	13.62	526-95-4	HMD800625	33198	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
GDP1	184	Négatif	C10H15N5O11P2	442/0171	17.68	146-91-8	HMD801201	17552	9.94E-01	9.05E-01	9.72E-01
Galactose-1-phosphate / Glucose-1-phosphate / Mannose-1-phosphate / D-Fructose-1-phosphate / D-Mannose-6-phosphate / Glucose-6-PO4 / D-Fructose-6-phosphate	1186 / 281 / 416 / 477 / 490 / 65 / 700	Négatif	C6H13O9P	259/0224	16.07	2255-14-3 / 59-56-3 / 27251-84-9 / 15978-08-2 / 3672-15-9 / 56-73-5 / 643-13-0	HMD800645 / HMD801586 / HMD806330 / HMD801076 / HMD801078 / HMD801401 / HMD800124	17973 / 16077 / 35374 / 704854 / 49728 / 4170 / 15946	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Glucosamine-6-phosphate1	701	Négatif	C6H14NO8P	258/0384	16.17	3616-42-0	HMD801254	15873	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Fructose-1-6-bisphosphate / D-Glucose-1-6-bisphosphate	246 / 42	Négatif	C6H14O12P2	338/9888	17.6	488-69-7 / 10139-18-1	HMD801058 / HMD803514	16905 / 18148	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
cis-cis-Muconic-acid	447	Négatif	C6H6O4	141/0193	15.92	1119-72-8	HMD806331	16508	9.94E-01	9.46E-01	9.72E-01
X1-methyl-guanine / 7-methylguanin1	121 / 7	Négatif	C6H7N5O	164/0578	7.29	938-85-2 / 578-76-7	HMD803282 / HMD800897	21803 / 28664	9.94E-01	9.07E-01	9.72E-01
Imidazolelactic-acid1	283	Négatif	C6H8N2O3...	155/0462	11.1	876-19-7	HMD802320	27487	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
dGTP / ATP1	182 / 55	Négatif	C10H16N5O13P3	505/9885	16.42	2564-35-4 / 56-65-5	HMD801440 / HMD800538	16497 / 15422	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-glutamic-acid / N-acetyl-DL-glutamic-acid1	576 / 898	Négatif	C7H11NO5	188/0564	14.89	1188-37-0 / 1188-37-0	HMD801138 / HMD801138	12575 / 12575	9.94E-01	9.46E-01	9.72E-01
N-acetyl-L-glutamine1	890	Négatif	C7H12N2O4	187/0724	11.18	2490-97-3	HMD806029	73685	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
GTP1	153	Négatif	C10H16N5O14P3	521/9834	18.44	86-01-1	HMD801273	15996	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Cystathionine / L-Cystathionine1	127 / 259	Négatif	C7H14N2O4S	221/0602	15.76	535-34-2 / 56-88-2	HMD800455 / HMD800099	NA / 17482	9.94E-01	9.43E-01	9.72E-01
X4-Hydroxybenzaldehyde	294	Négatif	C7H6O2	121/0295	2.17	123-08-0	HMD811718	17597	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Pyridoxamine-5-phosphate1	614	Négatif	C8H13N2O5P	247/0489	15.62	529-96-4	HMD801555	18335	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
X4-Pyridoxic-acid	678	Négatif	C8H9NO4	182/0459	1.91	82-82-6	HMD800017	17405	9.94E-01	9.03E-01	9.83E-01
Phenylalanine1	27	Négatif	C9H11NO2	164/0717	8.17	63-91-2	HMD800159	17295	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Glutathione2	130	Négatif	C10H17N3O6S	306/0765	17.44	70-18-8	HMD800125	16856	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
beta-Pseudouridine1	1138	Négatif	C9H12N2O6	243/0623	10.98	1445-07-4	HMD800767	17802	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
X4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol-sulfate	786	Négatif	C9H12O7S	263/0231	6.61	71324-20-4	HMD803332	89644	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
UMP	172	Négatif	C9H13N2O9P	323/0286	15.98	58-97-9	HMD800288	16695	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
UDP1	171	Négatif	C9H14N2O12P2	402/9949	16.09	58-98-0	HMD800295	17659	9.94E-01	9.11E-01	9.72E-01
Nonanoic-acid	586	Négatif	C9H18O2	157/1234	1.76	112-05-0	HMD800847	29019	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Panthenol	253	Négatif	C9H19NO4	204/1241	2.71	81-13-0	HMD804231	27373	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Orotidine	736	Négatif	C10H12N2O8	287/0521	13.35	314-50-1	HMD800788	15842	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
N-Acetyl-L-carnosine1	1121	Négatif	C11H16N4O4	267/1099	10.6	56353-15-2	HMD812881	67249	9.94E-01	9.35E-01	9.72E-01
Leu-Pro1	1061	Négatif	C11H20N2O3	227/1401	3.64	87178-63-0	HMD811175	NA	9.94E-01	9.05E-01	9.72E-01
Inosine1	54	Négatif	C10H12N4O5	267/0735	10.43	58-63-9	HMD800195	17596	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Guanosine-5-diphospho-L-fucose	523	Négatif	C16H25N5O15P2	588/075	17.52	15839-70-0	HMD801095	17009	9.94E-01	9.07E-01	9.72E-01
Palmitic-acid	228	Négatif	C16H32O2	255/2329	1.43	57-10-3	HMD800220	15756	9.94E-01	9.46E-01	9.72E-01
Riboflavin1	74	Négatif	C17H20N4O6	375/131	6.2	83-88-5	HMD800244	17015	9.94E-01	9.46E-01	9.72E-01
UDP-N-acetylglucosamine1	1164	Négatif	C17H27N3O17P2	606/0743	16.17	528-04-1	HMD800290	16264	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Inosine2	54	Négatif	C10H12N4O5	267/0735	11.22	58-63-9	HMD800195	17596	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Prostaglandin-E1-1	609	Négatif	C20H34O5	353/2333	2.03	745-65-3	HMD801442	15544	9.94E-01	9.03E-01	9.83E-01
Prostaglandin-E1	609	Négatif	C20H34O5	353/2333	2.62	745-65-3	HMD801442	15544	9.94E-01	9.03E-01	9.99E-01
Inosine3	54	Négatif	C10H12N4O5	267/0735	11.7	58-63-9	HMD800195	17596	9.94E-01	9.27E-01	9.75E-01
NAD-1	59	Négatif	C21H27N7O14P2	662/1018	14.75	53-84-9	HMD800902	15846	9.94E-01	9.90E-01	9.72E-01
Behenic-acid	435	Négatif	C22H44O2	339/3269	1.33	112-85-6	HMD800944	28941	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Lignoceric-acid	550	Négatif	C24H48O2	367/3582	1.31	557-59-5	HMD802003	28866	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Oxalic-acid1	591	Négatif	C2H2O4	88/988	16.35	144-62-7	HMD802329	16995	9.94E-01	9.71E-01	9.72E-01
Phosphonoacetic-acid	601	Négatif	C2H5O5P	138/9802	15.86	4408-78-0	HMD804110	15732	9.9		

Taurine1	32	Négatif	C2H7NO3S	124/0074	14.07	107-35-7	HMDB00251	15891	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
O-Phosphorylethanolamine1	735	Négatif	C2H8NO4P	140/0118	15.78	1071-23-4	HMDB00224	17553	9.94E-01	9.05E-01	9.72E-01
D-Glyceric-acid	480	Négatif	C3H6O4	105/0193	11.9	473-81-4	HMDB00139	32398	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Cyclic-AMP	241	Négatif	C10H12NSO6P	328/0452	9.92	60-92-4	HMDB00058	17489	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Cysteine-S-sulfate	717	Négatif	C3H7NO5S2	199/9693	17	1637-71-4	HMDB00731	27891	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Dihydroxyacetone-phosphate	219	Négatif	C3H7O6P...	168/9907	15.7	57-04-5	HMDB01473	16108	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Fumaric-acid / Maleic-acid1	12 / 556	Négatif	C4H4O4	115/0037	15.22	110-17-8 / 110-16-7	HMDB00134 / HMDB00176	18012 / 183	9.94E-01	9.03E-01	9.72E-01
Asparagine	33	Négatif	C4H8N2O3	131/0462	14.79	70-47-3	HMDB00168	17196	9.96E-01	9.03E-01	9.72E-01
Dimethyl-oxalate	966	Négatif	C4H6O4	117/0193	15.9	553-90-2	NA	6859	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Erythrono-1-4-lactone	975	Négatif	C4H6O4	117/0193	15.95	17675-99-9	HMDB00349	290972	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Guanosine1	5	Négatif	C10H13N5O5	282/0844	11.53	118-00-3	HMDB00133	16750	9.98E-01	9.46E-01	9.72E-01
Valine / Betaine1	30 / 439	Négatif	C5H11NO2	116/0717	11.02	72-18-4 / 107-43-7	HMDB00883 / HMDB00043	16414 / 1775	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Penicillamine/S-ethyl-L-cysteine /Methionine1	1065 / 1095 / 28	Négatif	C5H11NO2S	148/0438	9.74	52-67-5 / 2629-59-6 / 63-68-3	HMDB14997 / NA / HMDB00696	50868 / NA / 16643	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Citraconic-acid / Glutaconic-acid / Itaconic-acid / Mesaconic-acid	451 / 516 / 540 / 562	Négatif	C5H6O4	129/0193	15.55	498-23-7 / 1724-02-3 / 97-65-4 / 498-24-8	HMDB00634 / HMDB00620 / HMDB02092 / HMDB00749	17626 / 15670 / 30838 / 16600	9.98E-01	9.07E-01	9.72E-01
Myo-inositol	76	Négatif	C6H12O6	179/0561	15.92	87-89-8	HMDB00211	17268	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Norleucine / Leucine1	1003 / 34	Négatif	C6H13NO2	130/0873	9.15	327-57-1 / 61-90-5	HMDB01645 / HMDB00687	18347 / 15603	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Norleucine / DL-Leucine / Isoleucine / Leucine1	1003 / 216 / 25 / 34	Négatif	C6H13NO2	130/0873	9.64	327-57-1 / 5699-54-7 / 73-32-5 / 61- 90-5	HMDB01645 / HMDB03640 / HMDB00172 / HMDB00687	18347 / 15604 / 17191 / 15603	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Glucose-1-phosphate	281	Négatif	C6H13O9P	259/0224	16.64	59-56-3	HMDB01586	16077	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
D-Fructose-1-phosphate	477	Négatif	C6H13O9P	259/0224	16.8	15978-08-2	HMDB01076	704854	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Galactose-1-phosphate / Mannose-1-phosphate / D-Mannose-6-phosphate	1186 / 416 / 490	Négatif	C6H13O9P	259/0224	16.85	2255-14-3 / 27251-84-9 / 3672-15-9	HMDB00645 / HMDB06330 / HMDB01078	17973 / 35374 / 49728	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Glucose-6-PO4 / D-Fructose-6-phosphate	65 / 7	Négatif	C6H13O9P	259/0224	16.95	56-73-5 / 643-13-0	HMDB01401 / HMDB00124	4170 / 15946	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Arginine1	35	Négatif	C6H14N4O2	173/1044	17.15	74-79-3	HMDB00517	16467	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Fructose-1-6-bisphosphate / D-Glucose-1-6-bisphosphate1	246 / 42	Négatif	C6H14O12P2	338/9888	16.48	488-69-7 / 10139-18-1	HMDB01058 / HMDB03514	16905 / 18148	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
X2-Aminopyridine-3-carboxylic-acid	1077	Négatif	C6H6N2O2	137/0357	7.19	5345-47-1	HMDB61680	68572	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Ascorbic-acid-2-sulfate	789	Négatif	C6H8O9S	254/9816	19.67	NA	HMDB60649	NA	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Histidine1	22	Négatif	C6H9N3O2	154/0622	13.35	71-00-1	HMDB00177	15971	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Salicylic-acid / 2-5-Dihydroxybenzaldehyde	167 / 37	Négatif	C7H6O3	137/0244	1.97	69-72-7 / 1194-98-5	HMDB01895 / HMDB04062	16914 / 28508	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Octanoic-acid	589	Négatif	C8H16O2	143/1077	1.89	NA	NA	28837	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Cyclic-ADP-ribose	1001	Négatif	C15H21N5O13P2	540/0538	14.75	119340-53-3	NA	NA	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Uridine-5-diphosphoglucuronic-acid	645	Négatif	C15H22N2O18P2	579/027	18.78	2616-64-0	HMDB00935	17200	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
X13-S-Hydroxyoctadeca-9Z-11E-dienoic-acid	360	Négatif	C18H32O3	295/2279	1.53	NA	NA	NA	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Glutathione-oxidized1	811	Négatif	C20H32N6O12S2	611/1447	17.5	27025-41-8	HMDB03337	17858	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Nervonic-acid	732	Négatif	C24H46O2	365/3425	1.3	506-37-6	HMDB02368	44247	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Phosphoenolpyruvic-acid1	254	Négatif	C3H5O6P...	166/9751	15.99	138-08-9	HMDB00263	44897	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
Phosphoenolpyruvic-acid	254	Négatif	C3H5O6P...	166/9751	17.21	138-08-9	HMDB00263	44897	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
L-Cysteinesulfinic-acid	547	Négatif	C3H7NO4S	152/0023	8.81	1115-65-7	HMDB00996	41721	9.98E-01	9.03E-01	9.72E-01
X3-Methyl-2-oxovaleric-acid / 2-Ketohexanoic-acid / 4-Methyl-2-oxovaleric-acid	1036 / 1143 / 888	Négatif	C6H10O3	129/0557	1.97	1460-34-0 / 2492-75-3 / 816-66-0	HMDB00491 / HMDB01864 / HMDB00695	35932 / 17308 / 48430	9.99E-01	9.03E-01	9.72E-01
Riboflavin-5-monophosphate	741	Négatif	C17H21N4O9P	455/0973	12.59	146-17-8	HMDB01520	17621	9.99E-01	9.03E-01	9.72E-01

Tableau IV. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans le foie

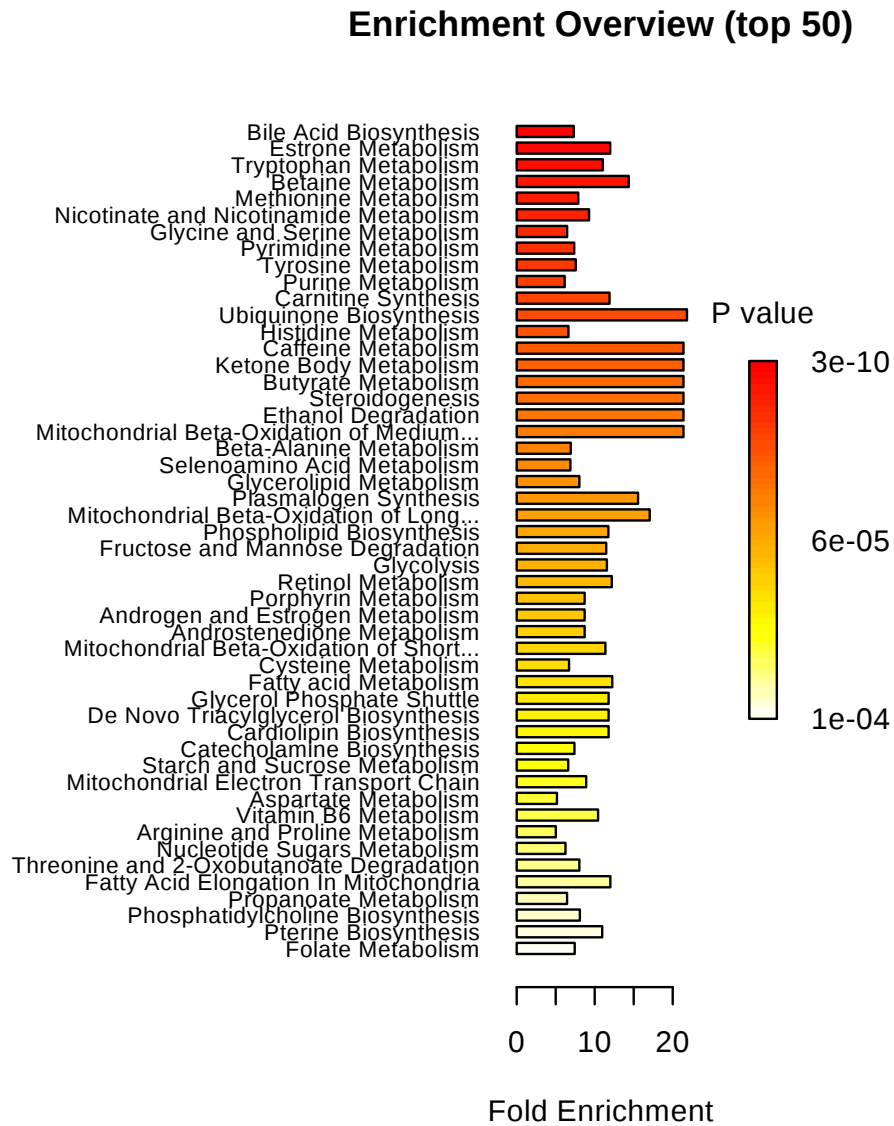


Figure 1: Summary plot for Quantitative Enrichment Analysis (QEA).

Table 2: Result from Quantitative Enrichment Analysis

	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Expected Q	Raw p	Holm p	FDR
Bile Acid Biosynthesis	65	7	20.92	2.86	3.04E-12	2.80E-10	2.80E-10
Estrone Metabolism	24	4	34.26	2.86	7.70E-12	7.01E-10	3.54E-10
Tryptophan Metabolism	60	7	31.56	2.86	1.80E-11	1.62E-09	5.52E-10
Betaine Metabolism	21	6	41.06	2.86	9.97E-11	8.87E-09	2.29E-09
Methionine Metabolism	43	13	22.55	2.86	3.56E-10	3.13E-08	6.55E-09
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	8	26.51	2.86	7.77E-10	6.76E-08	1.19E-08
Glycine and Serine Metabolism	59	18	18.48	2.86	3.22E-09	2.77E-07	4.23E-08
Pyrimidine Metabolism	59	15	21.07	2.86	3.69E-09	3.14E-07	4.24E-08
Tyrosine Metabolism	72	8	21.63	2.86	7.33E-09	6.16E-07	7.10E-08
Purine Metabolism	74	21	17.59	2.86	7.71E-09	6.40E-07	7.10E-08
Carnitine Synthesis	22	6	34.01	2.86	8.72E-09	7.15E-07	7.29E-08
Ubiquinone Biosynthesis	20	1	62.37	2.86	1.03E-08	8.33E-07	7.89E-08
Histidine Metabolism	43	12	18.96	2.86	1.40E-08	1.12E-06	8.86E-08
Caffeine Metabolism	24	1	61.10	2.86	1.83E-08	1.45E-06	8.86E-08
Ketone Body Metabolism	13	1	61.10	2.86	1.83E-08	1.45E-06	8.86E-08
Butyrate Metabolism	19	1	61.10	2.86	1.83E-08	1.45E-06	8.86E-08
Steroidogenesis	43	1	61.10	2.86	1.83E-08	1.45E-06	8.86E-08
Ethanol Degradation	19	1	61.10	2.86	1.83E-08	1.45E-06	8.86E-08
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	1	61.10	2.86	1.83E-08	1.45E-06	8.86E-08
Beta-Alanine Metabolism	34	12	19.81	2.86	2.02E-08	1.47E-06	9.28E-08
Selenoamino Acid Metabolism	28	5	19.67	2.86	2.91E-08	2.10E-06	1.28E-07
Glycerolipid Metabolism	25	6	22.96	2.86	5.17E-08	3.67E-06	2.16E-07
Plasmalogen Synthesis	26	3	44.46	2.86	5.62E-08	3.94E-06	2.25E-07
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	2	48.74	2.86	6.99E-08	4.82E-06	2.68E-07
Phospholipid Biosynthesis	29	4	33.58	2.86	8.06E-08	5.48E-06	2.97E-07
Fructose and Mannose Degradation	32	4	32.79	2.86	9.89E-08	6.63E-06	3.50E-07
Glycolysis	25	4	33.04	2.86	1.11E-07	7.33E-06	3.78E-07
Retinol Metabolism	37	2	34.84	2.86	1.42E-07	9.24E-06	4.33E-07
Porphyrin Metabolism	40	3	24.89	2.86	1.46E-07	9.34E-06	4.33E-07
Androgen and Estrogen Metabolism	33	3	24.89	2.86	1.46E-07	9.34E-06	4.33E-07
Androstenedione Metabolism	24	3	24.89	2.86	1.46E-07	9.34E-06	4.33E-07
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	3	32.50	2.86	3.65E-07	2.23E-05	1.05E-06
Cysteine Metabolism	26	6	19.18	2.86	3.78E-07	2.27E-05	1.05E-06
Fatty acid Metabolism	43	3	35.00	2.86	4.38E-07	2.59E-05	1.19E-06
Glycerol Phosphate Shuttle	11	3	33.67	2.86	4.78E-07	2.78E-05	1.19E-06
De Novo Triacylglycerol Biosynthesis	9	3	33.67	2.86	4.78E-07	2.78E-05	1.19E-06
Cardiolipin Biosynthesis	11	3	33.67	2.86	4.78E-07	2.78E-05	1.19E-06
Catecholamine Biosynthesis	20	4	21.14	2.86	4.92E-07	2.78E-05	1.19E-06
Starch and Sucrose Metabolism	31	4	18.88	2.86	5.60E-07	3.03E-05	1.32E-06
Mitochondrial Electron Transport Chain	19	4	25.46	2.86	6.26E-07	3.32E-05	1.44E-06
Aspartate Metabolism	35	11	14.74	2.86	7.37E-07	3.83E-05	1.65E-06
Vitamin B6 Metabolism	20	3	29.82	2.86	1.02E-06	5.21E-05	2.22E-06
Arginine and Proline Metabolism	53	14	14.34	2.86	1.04E-06	5.21E-05	2.22E-06
Nucleotide Sugars Metabolism	20	4	17.87	2.86	1.25E-06	6.14E-05	2.61E-06
Threonine and 2-Oxobutanoate Degradation	20	4	22.95	2.86	1.28E-06	6.14E-05	2.61E-06
Fatty Acid Elongation In Mitochondria	35	2	34.31	2.86	1.34E-06	6.28E-05	2.67E-06
Propanoate Metabolism	42	7	18.45	2.86	1.40E-06	6.44E-05	2.74E-06
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	3	23.14	2.86	1.64E-06	7.40E-05	3.15E-06
Pterine Biosynthesis	29	3	31.32	2.86	1.81E-06	7.99E-05	3.41E-06
Folate Metabolism	29	4	21.25	2.86	2.65E-06	1.14E-04	4.88E-06
Inositol Metabolism	33	3	23.35	2.86	3.41E-06	1.43E-04	6.03E-06
Inositol Phosphate Metabolism	26	3	23.35	2.86	3.41E-06	1.43E-04	6.03E-06
Pyruvate Metabolism	48	5	22.87	2.86	3.94E-06	1.58E-04	6.81E-06
Gluconeogenesis	35	7	21.90	2.86	4.00E-06	1.58E-04	6.81E-06
Taurine and Hypotaurine Metabolism	12	4	30.05	2.86	6.53E-06	2.48E-04	1.09E-05
Urea Cycle	29	9	12.81	2.86	9.49E-06	3.51E-04	1.56E-05
Lysine Degradation	30	6	18.10	2.86	1.21E-05	4.35E-04	1.95E-05
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	3	20.64	2.86	1.45E-05	5.07E-04	2.30E-05
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	3	23.39	2.86	2.37E-05	8.06E-04	3.66E-05
Warburg Effect	58	9	18.31	2.86	2.38E-05	8.06E-04	3.66E-05
Pentose Phosphate Pathway	29	4	24.87	2.86	4.14E-05	1.33E-03	6.25E-05
Citric Acid Cycle	32	5	16.62	2.86	7.45E-05	2.31E-03	1.11E-04
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	6	14.50	2.86	1.15E-04	3.45E-03	1.68E-04
Glucose-Alanine Cycle	13	3	20.39	2.86	1.46E-04	4.24E-03	2.10E-04
Galactose Metabolism	38	6	15.43	2.86	2.05E-04	5.75E-03	2.87E-04

Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	5	17.60	2.86	2.06E-04	5.75E-03	2.87E-04
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	6	13.09	2.86	4.18E-04	1.09E-02	5.69E-04
Lactose Synthesis	20	4	18.65	2.86	4.21E-04	1.09E-02	5.69E-04
Sphingolipid Metabolism	40	6	12.40	2.86	6.45E-04	1.55E-02	8.60E-04
Malate-Aspartate Shuttle	10	4	15.44	2.86	7.05E-04	1.62E-02	9.27E-04
Glutamate Metabolism	49	12	10.39	2.86	7.83E-04	1.72E-02	1.02E-03
Ammonia Recycling	32	9	11.03	2.86	1.34E-03	2.82E-02	1.71E-03
Alpha Linolenic Acid and Linoleic Acid Metabolism	19	3	20.36	2.86	2.10E-03	4.20E-02	2.64E-03
Riboflavin Metabolism	20	3	16.87	2.86	2.12E-03	4.20E-02	2.64E-03
Amino Sugar Metabolism	33	7	9.10	2.86	3.03E-03	5.46E-02	3.72E-03
Homocysteine Degradation	9	3	11.98	2.86	3.82E-03	6.49E-02	4.62E-03
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	28	5	10.10	2.86	1.02E-02	1.63E-01	1.22E-02
Fatty Acid Biosynthesis	35	6	7.94	2.86	2.34E-02	3.51E-01	2.76E-02
Thyroid hormone synthesis	13	1	8.67	2.86	8.13E-02	1.00E+00	9.47E-02
Pantothenate and CoA Biosynthesis	21	5	4.60	2.86	1.61E-01	1.00E+00	1.85E-01
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis	12	3	4.72	2.86	1.75E-01	1.00E+00	1.99E-01
Biotin Metabolism	8	2	4.79	2.86	1.86E-01	1.00E+00	2.08E-01
Phosphatidylinositol Phosphate Metabolism	17	2	4.47	2.86	2.13E-01	1.00E+00	2.36E-01
Steroid Biosynthesis	48	2	4.18	2.86	2.37E-01	1.00E+00	2.59E-01
Glutathione Metabolism	21	5	3.84	2.86	2.47E-01	1.00E+00	2.68E-01
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	3	3.11	2.86	3.52E-01	1.00E+00	3.77E-01
Alanine Metabolism	17	4	2.29	2.86	5.08E-01	1.00E+00	5.38E-01
Sulfate/Sulfite Metabolism	22	1	0.83	2.86	5.98E-01	1.00E+00	6.01E-01
Thiamine Metabolism	9	1	0.83	2.86	5.98E-01	1.00E+00	6.01E-01
Lactose Degradation	9	1	0.83	2.86	5.98E-01	1.00E+00	6.01E-01
Trehalose Degradation	11	1	0.83	2.86	5.98E-01	1.00E+00	6.01E-01
Arachidonic Acid Metabolism	69	4	1.71	2.86	6.01E-01	1.00E+00	6.01E-01

**Tableau V. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans l'hypothalamus**

**Enrichment Overview (top 50)**

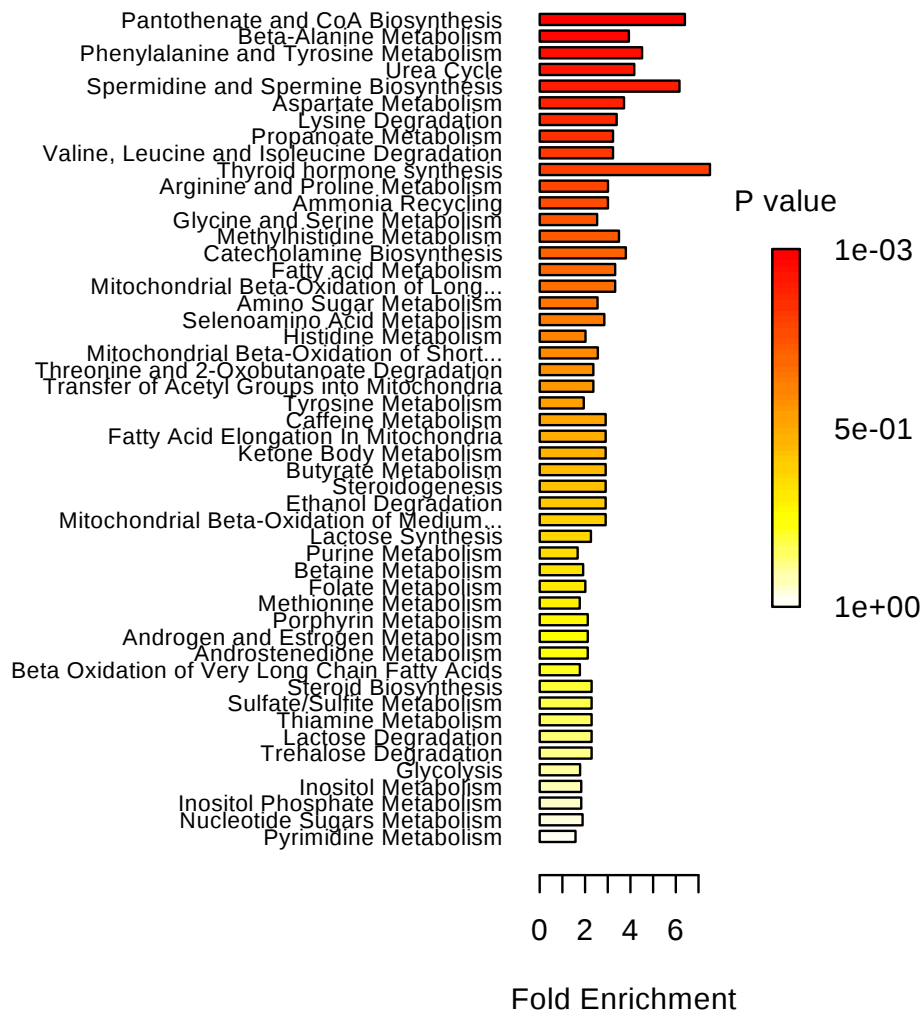


Figure 1: Summary plot for Quantitative Enrichment Analysis (QEA).

Table 2: Result from Quantitative Enrichment Analysis

	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Expected Q	Raw p	Holm p	FDR
Pantothenate and CoA Biosynthesis	21	4	18.83	2.94	1.45E-05	1.35E-03	1.35E-03
Beta-Alanine Metabolism	34	11	11.57	2.94	3.84E-04	3.53E-02	1.32E-02
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	28	5	13.28	2.94	6.09E-04	5.54E-02	1.32E-02
Urea Cycle	29	10	12.26	2.94	7.13E-04	6.41E-02	1.32E-02
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	2	18.13	2.94	8.29E-04	7.38E-02	1.32E-02
Aspartate Metabolism	35	12	10.93	2.94	8.52E-04	7.50E-02	1.32E-02
Lysine Degradation	30	6	9.98	2.94	3.47E-03	3.02E-01	4.09E-02
Propanoate Metabolism	42	6	9.51	2.94	4.39E-03	3.78E-01	4.09E-02
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	6	9.51	2.94	4.39E-03	3.78E-01	4.09E-02
Thyroid hormone synthesis	13	1	22.08	2.94	4.40E-03	3.78E-01	4.09E-02
Arginine and Proline Metabolism	53	15	8.85	2.94	5.10E-03	4.24E-01	4.32E-02
Ammonia Recycling	32	9	8.85	2.94	9.29E-03	7.62E-01	7.20E-02
Glycine and Serine Metabolism	59	12	7.45	2.94	1.94E-02	1.00E+00	1.38E-01
Methylhistidine Metabolism	4	3	10.28	2.94	2.37E-02	1.00E+00	1.58E-01
Catecholamine Biosynthesis	20	2	11.17	2.94	2.63E-02	1.00E+00	1.63E-01
Fatty acid Metabolism	43	2	9.79	2.94	3.39E-02	1.00E+00	1.86E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	2	9.79	2.94	3.39E-02	1.00E+00	1.86E-01
Amino Sugar Metabolism	33	7	7.50	2.94	3.61E-02	1.00E+00	1.86E-01
Selenoamino Acid Metabolism	28	4	8.38	2.94	4.41E-02	1.00E+00	2.16E-01
Histidine Metabolism	43	12	5.94	2.94	5.15E-02	1.00E+00	2.40E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	3	7.54	2.94	5.61E-02	1.00E+00	2.48E-01
Threonine and 2-Oxobutanoate Degradation	20	3	6.96	2.94	6.35E-02	1.00E+00	2.57E-01
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	3	6.96	2.94	6.35E-02	1.00E+00	2.57E-01
Tyrosine Metabolism	72	7	5.71	2.94	7.21E-02	1.00E+00	2.59E-01
Caffeine Metabolism	24	1	8.55	2.94	8.82E-02	1.00E+00	2.59E-01
Fatty Acid Elongation In Mitochondria	35	1	8.55	2.94	8.82E-02	1.00E+00	2.59E-01
Ketone Body Metabolism	13	1	8.55	2.94	8.82E-02	1.00E+00	2.59E-01
Butyrate Metabolism	19	1	8.55	2.94	8.82E-02	1.00E+00	2.59E-01
Steroidogenesis	43	1	8.55	2.94	8.82E-02	1.00E+00	2.59E-01
Ethanol Degradation	19	1	8.55	2.94	8.82E-02	1.00E+00	2.59E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	1	8.55	2.94	8.82E-02	1.00E+00	2.59E-01
Lactose Synthesis	20	4	6.64	2.94	1.08E-01	1.00E+00	2.59E-01
Purine Metabolism	74	20	4.92	2.94	1.09E-01	1.00E+00	2.59E-01
Betaine Metabolism	21	4	5.63	2.94	1.11E-01	1.00E+00	2.59E-01
Folate Metabolism	29	3	5.92	2.94	1.12E-01	1.00E+00	2.59E-01
Methionine Metabolism	43	7	5.19	2.94	1.12E-01	1.00E+00	2.59E-01
Porphyrin Metabolism	40	2	6.23	2.94	1.19E-01	1.00E+00	2.59E-01
Androgen and Estrogen Metabolism	33	2	6.23	2.94	1.19E-01	1.00E+00	2.59E-01
Androstenedione Metabolism	24	2	6.23	2.94	1.19E-01	1.00E+00	2.59E-01
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	4	5.21	2.94	1.31E-01	1.00E+00	2.59E-01
Steroid Biosynthesis	48	1	6.73	2.94	1.32E-01	1.00E+00	2.59E-01
Sulfate/Sulfite Metabolism	22	1	6.73	2.94	1.32E-01	1.00E+00	2.59E-01
Thiamine Metabolism	9	1	6.73	2.94	1.32E-01	1.00E+00	2.59E-01
Lactose Degradation	9	1	6.73	2.94	1.32E-01	1.00E+00	2.59E-01
Trehalose Degradation	11	1	6.73	2.94	1.32E-01	1.00E+00	2.59E-01
Glycolysis	25	4	5.24	2.94	1.34E-01	1.00E+00	2.59E-01
Inositol Metabolism	33	3	5.39	2.94	1.36E-01	1.00E+00	2.59E-01
Inositol Phosphate Metabolism	26	3	5.39	2.94	1.36E-01	1.00E+00	2.59E-01
Nucleotide Sugars Metabolism	20	3	5.56	2.94	1.37E-01	1.00E+00	2.59E-01
Pyrimidine Metabolism	59	11	4.64	2.94	1.39E-01	1.00E+00	2.59E-01
Mitochondrial Electron Transport Chain	19	5	4.81	2.94	1.46E-01	1.00E+00	2.64E-01
Carnitine Synthesis	22	6	4.71	2.94	1.48E-01	1.00E+00	2.64E-01
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	3	5.14	2.94	1.53E-01	1.00E+00	2.64E-01
Bile Acid Biosynthesis	65	3	5.15	2.94	1.54E-01	1.00E+00	2.64E-01
Homocysteine Degradation	9	1	5.92	2.94	1.59E-01	1.00E+00	2.64E-01
Starch and Sucrose Metabolism	31	4	4.92	2.94	1.59E-01	1.00E+00	2.64E-01
Glutamate Metabolism	49	10	4.11	2.94	1.96E-01	1.00E+00	3.20E-01
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis	12	3	4.39	2.94	2.18E-01	1.00E+00	3.24E-01
Sphingolipid Metabolism	40	4	4.27	2.94	2.20E-01	1.00E+00	3.24E-01
Estrone Metabolism	24	3	4.24	2.94	2.30E-01	1.00E+00	3.24E-01
Biotin Metabolism	8	2	4.36	2.94	2.31E-01	1.00E+00	3.24E-01
Retinol Metabolism	37	2	4.29	2.94	2.32E-01	1.00E+00	3.24E-01
Fatty Acid Biosynthesis	35	2	4.32	2.94	2.34E-01	1.00E+00	3.24E-01
Pterine Biosynthesis	29	2	4.28	2.94	2.34E-01	1.00E+00	3.24E-01
Glycerol Phosphate Shuttle	11	3	4.19	2.94	2.35E-01	1.00E+00	3.24E-01

De Novo Triacylglycerol Biosynthesis	9	3	4.19	2.94	2.35E-01	1.00E+00	3.24E-01
Cardiolipin Biosynthesis	11	3	4.19	2.94	2.35E-01	1.00E+00	3.24E-01
Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	5	4.02	2.94	2.37E-01	1.00E+00	3.24E-01
Pyruvate Metabolism	48	7	3.89	2.94	2.42E-01	1.00E+00	3.26E-01
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	5	3.91	2.94	2.46E-01	1.00E+00	3.26E-01
Glycerolipid Metabolism	25	5	3.90	2.94	2.49E-01	1.00E+00	3.26E-01
Citric Acid Cycle	32	7	3.70	2.94	2.67E-01	1.00E+00	3.45E-01
Galactose Metabolism	38	6	3.66	2.94	2.77E-01	1.00E+00	3.48E-01
Alanine Metabolism	17	4	3.73	2.94	2.80E-01	1.00E+00	3.48E-01
Phosphatidylinositol Phosphate Metabolism	17	2	3.81	2.94	2.81E-01	1.00E+00	3.48E-01
Glucose-Alanine Cycle	13	3	3.72	2.94	2.90E-01	1.00E+00	3.54E-01
Cysteine Metabolism	26	5	3.59	2.94	2.97E-01	1.00E+00	3.59E-01
Fructose and Mannose Degradation	32	5	3.52	2.94	3.08E-01	1.00E+00	3.67E-01
Riboflavin Metabolism	20	2	3.50	2.94	3.13E-01	1.00E+00	3.69E-01
Phospholipid Biosynthesis	29	4	3.46	2.94	3.20E-01	1.00E+00	3.72E-01
Gluconeogenesis	35	8	3.36	2.94	3.27E-01	1.00E+00	3.76E-01
Plasmalogen Synthesis	26	3	3.36	2.94	3.33E-01	1.00E+00	3.78E-01
Malate-Aspartate Shuttle	10	4	3.23	2.94	3.54E-01	1.00E+00	3.97E-01
Warburg Effect	58	11	3.17	2.94	3.67E-01	1.00E+00	4.06E-01
Tryptophan Metabolism	60	4	2.86	2.94	4.18E-01	1.00E+00	4.57E-01
Pentose Phosphate Pathway	29	4	2.75	2.94	4.38E-01	1.00E+00	4.74E-01
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	3	2.50	2.94	4.44E-01	1.00E+00	4.75E-01
Glutathione Metabolism	21	5	2.44	2.94	4.83E-01	1.00E+00	5.11E-01
Pyruvaldehyde Degradation	10	1	0.75	2.94	6.21E-01	1.00E+00	6.49E-01
Arachidonic Acid Metabolism	69	3	1.58	2.94	6.37E-01	1.00E+00	6.58E-01
Vitamin B6 Metabolism	20	2	1.09	2.94	6.69E-01	1.00E+00	6.84E-01
Ubiquinone Biosynthesis	20	1	0.27	2.94	7.69E-01	1.00E+00	7.77E-01
Taurine and Hypotaurine Metabolism	12	2	0.09	2.94	9.71E-01	1.00E+00	9.71E-01



**Tableau VI. Métabolomique - Analyse d'enrichissement quantitatif des voies métaboliques dans le bulbe olfactif**

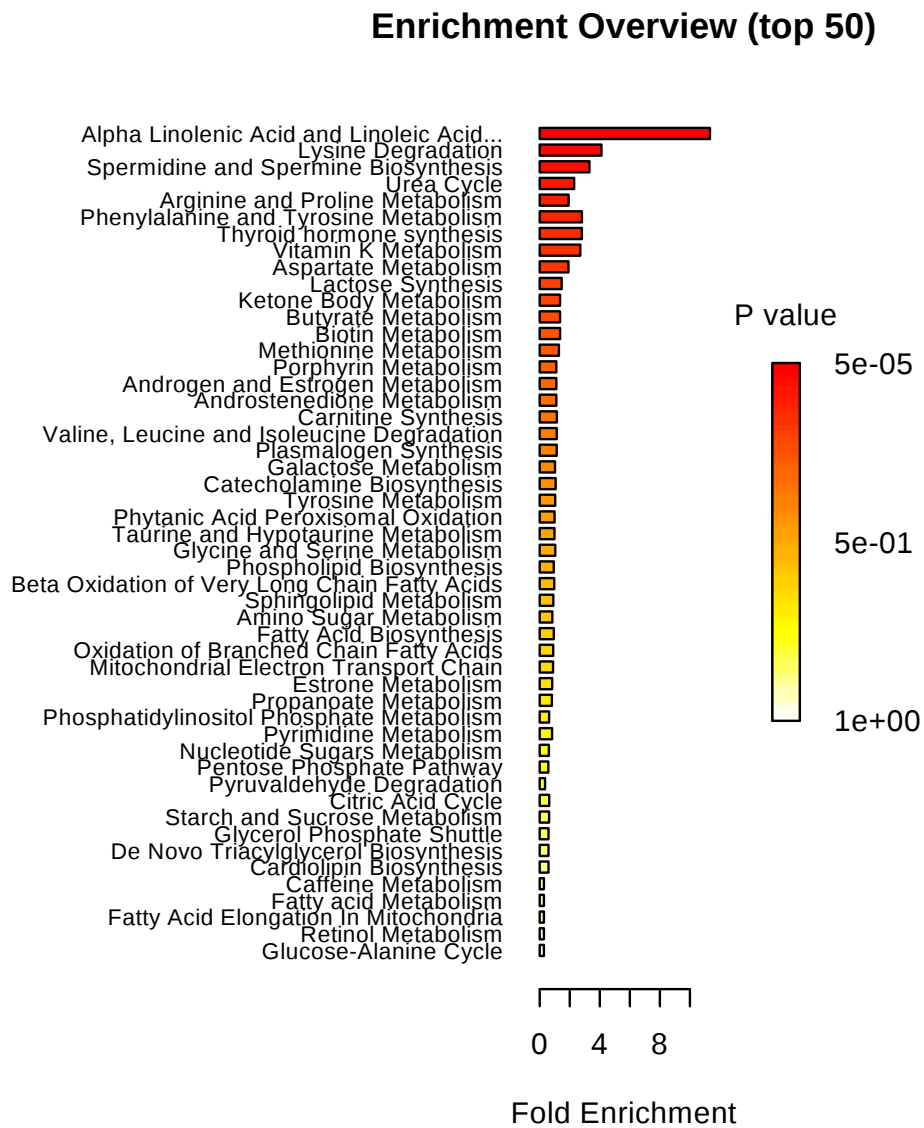


Figure 1: Summary plot for Quantitative Enrichment Analysis (QEA).

Table 2: Result from Quantitative Enrichment Analysis

	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Expected Q	Raw p	Holm p	FDR
Alpha Linolenic Acid and Linoleic Acid Metabolism	19	3	33.34	2.94	5.11E-07	4.86E-05	4.86E-05
Lysine Degradation	30	4	12.10	2.94	2.91E-03	2.73E-01	1.38E-01
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	2	9.75	2.94	3.49E-02	1.00E+00	9.19E-01
Urea Cycle	29	5	6.75	2.94	7.10E-02	1.00E+00	9.19E-01
Arginine and Proline Metabolism	53	9	5.67	2.94	8.95E-02	1.00E+00	9.19E-01
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	28	1	8.26	2.94	9.41E-02	1.00E+00	9.19E-01
Thyroid hormone synthesis	13	1	8.26	2.94	9.41E-02	1.00E+00	9.19E-01
Vitamin K Metabolism	14	1	7.96	2.94	1.01E-01	1.00E+00	9.19E-01
Aspartate Metabolism	35	6	5.63	2.94	1.19E-01	1.00E+00	9.19E-01
Lactose Synthesis	20	5	4.30	2.94	2.16E-01	1.00E+00	9.19E-01
Ketone Body Metabolism	13	2	3.99	2.94	2.53E-01	1.00E+00	9.19E-01
Butyrate Metabolism	19	2	3.99	2.94	2.53E-01	1.00E+00	9.19E-01
Biotin Metabolism	8	2	4.00	2.94	2.54E-01	1.00E+00	9.19E-01
Methionine Metabolism	43	8	3.77	2.94	2.55E-01	1.00E+00	9.19E-01
Porphyrin Metabolism	40	3	3.26	2.94	3.13E-01	1.00E+00	9.19E-01
Androgen and Estrogen Metabolism	33	3	3.26	2.94	3.13E-01	1.00E+00	9.19E-01
Androstenedione Metabolism	24	3	3.26	2.94	3.13E-01	1.00E+00	9.19E-01
Carnitine Synthesis	22	5	3.36	2.94	3.17E-01	1.00E+00	9.19E-01
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	5	3.34	2.94	3.18E-01	1.00E+00	9.19E-01
Plasmalogen Synthesis	26	3	3.33	2.94	3.32E-01	1.00E+00	9.19E-01
Galactose Metabolism	38	7	3.00	2.94	3.47E-01	1.00E+00	9.19E-01
Catecholamine Biosynthesis	20	3	3.12	2.94	3.53E-01	1.00E+00	9.19E-01
Tyrosine Metabolism	72	3	3.04	2.94	3.63E-01	1.00E+00	9.19E-01
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	3	2.91	2.94	3.74E-01	1.00E+00	9.19E-01
Taurine and Hypotaurine Metabolism	12	2	2.89	2.94	3.77E-01	1.00E+00	9.19E-01
Glycine and Serine Metabolism	59	10	3.05	2.94	3.81E-01	1.00E+00	9.19E-01
Phospholipid Biosynthesis	29	4	2.76	2.94	4.10E-01	1.00E+00	9.19E-01
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	5	2.85	2.94	4.21E-01	1.00E+00	9.19E-01
Sphingolipid Metabolism	40	5	2.67	2.94	4.28E-01	1.00E+00	9.19E-01
Amino Sugar Metabolism	33	6	2.48	2.94	4.32E-01	1.00E+00	9.19E-01
Fatty Acid Biosynthesis	35	5	2.77	2.94	4.33E-01	1.00E+00	9.19E-01
Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	3	2.64	2.94	4.46E-01	1.00E+00	9.19E-01
Mitochondrial Electron Transport Chain	19	5	2.62	2.94	4.47E-01	1.00E+00	9.19E-01
Estrone Metabolism	24	4	2.45	2.94	4.64E-01	1.00E+00	9.19E-01
Propanoate Metabolism	42	4	2.39	2.94	4.70E-01	1.00E+00	9.19E-01
Phosphatidylinositol Phosphate Metabolism	17	2	1.84	2.94	4.85E-01	1.00E+00	9.19E-01
Pyrimidine Metabolism	59	11	2.43	2.94	5.24E-01	1.00E+00	9.19E-01
Nucleotide Sugars Metabolism	20	5	1.80	2.94	5.37E-01	1.00E+00	9.19E-01
Pentose Phosphate Pathway	29	4	1.69	2.94	5.51E-01	1.00E+00	9.19E-01
Pyruvaldehyde Degradation	10	1	1.05	2.94	5.58E-01	1.00E+00	9.19E-01
Citric Acid Cycle	32	6	1.86	2.94	5.76E-01	1.00E+00	9.19E-01
Starch and Sucrose Metabolism	31	6	1.84	2.94	5.84E-01	1.00E+00	9.19E-01
Glycerol Phosphate Shuttle	11	3	1.73	2.94	5.98E-01	1.00E+00	9.19E-01
De Novo Triacylglycerol Biosynthesis	9	3	1.73	2.94	5.98E-01	1.00E+00	9.19E-01
Cardiolipin Biosynthesis	11	3	1.73	2.94	5.98E-01	1.00E+00	9.19E-01
Caffeine Metabolism	24	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Fatty acid Metabolism	43	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Fatty Acid Elongation In Mitochondria	35	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Retinol Metabolism	37	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Glucose-Alanine Cycle	13	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Malate-Aspartate Shuttle	10	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Steroidogenesis	43	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Ethanol Degradation	19	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	1	0.83	2.94	6.04E-01	1.00E+00	9.19E-01
Warburg Effect	58	10	1.89	2.94	6.08E-01	1.00E+00	9.19E-01
Cysteine Metabolism	26	4	1.84	2.94	6.08E-01	1.00E+00	9.19E-01
Inositol Metabolism	33	3	1.50	2.94	6.09E-01	1.00E+00	9.19E-01
Inositol Phosphate Metabolism	26	3	1.50	2.94	6.09E-01	1.00E+00	9.19E-01
Steroid Biosynthesis	48	1	0.76	2.94	6.19E-01	1.00E+00	9.19E-01
Sulfate/Sulfite Metabolism	22	1	0.76	2.94	6.19E-01	1.00E+00	9.19E-01
Thiamine Metabolism	9	1	0.76	2.94	6.19E-01	1.00E+00	9.19E-01
Lactose Degradation	9	1	0.76	2.94	6.19E-01	1.00E+00	9.19E-01
Trehalose Degradation	11	1	0.76	2.94	6.19E-01	1.00E+00	9.19E-01
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis	12	3	1.42	2.94	6.42E-01	1.00E+00	9.32E-01

Glutamate Metabolism	49	10	1.91	2.94	6.53E-01	1.00E+00	9.32E-01
Betaine Metabolism	21	3	1.54	2.94	6.67E-01	1.00E+00	9.32E-01
Fructose and Mannose Degradation	32	6	1.32	2.94	6.82E-01	1.00E+00	9.32E-01
Purine Metabolism	74	13	1.58	2.94	6.89E-01	1.00E+00	9.32E-01
Glycolysis	25	5	1.38	2.94	7.22E-01	1.00E+00	9.32E-01
Bile Acid Biosynthesis	65	2	0.79	2.94	7.33E-01	1.00E+00	9.32E-01
Folate Metabolism	29	2	0.79	2.94	7.33E-01	1.00E+00	9.32E-01
Homocysteine Degradation	9	2	0.92	2.94	7.43E-01	1.00E+00	9.32E-01
Selenoamino Acid Metabolism	28	3	1.13	2.94	7.46E-01	1.00E+00	9.32E-01
Ammonia Recycling	32	5	1.26	2.94	7.47E-01	1.00E+00	9.32E-01
Riboflavin Metabolism	20	3	0.93	2.94	7.73E-01	1.00E+00	9.32E-01
Histidine Metabolism	43	8	1.38	2.94	7.79E-01	1.00E+00	9.32E-01
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	3	0.82	2.94	7.84E-01	1.00E+00	9.32E-01
Glycerolipid Metabolism	25	5	1.19	2.94	7.88E-01	1.00E+00	9.32E-01
Gluconeogenesis	35	8	1.17	2.94	7.94E-01	1.00E+00	9.32E-01
Pterine Biosynthesis	29	3	0.98	2.94	7.97E-01	1.00E+00	9.32E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	3	0.91	2.94	8.05E-01	1.00E+00	9.32E-01
Beta-Alanine Metabolism	34	4	0.97	2.94	8.26E-01	1.00E+00	9.32E-01
Arachidonic Acid Metabolism	69	2	0.54	2.94	8.35E-01	1.00E+00	9.32E-01
Pyruvate Metabolism	48	7	0.98	2.94	8.49E-01	1.00E+00	9.32E-01
Alanine Metabolism	17	2	0.38	2.94	8.75E-01	1.00E+00	9.32E-01
Threonine and 2-Oxobutanoate Degradation	20	3	0.53	2.94	8.78E-01	1.00E+00	9.32E-01
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	3	0.53	2.94	8.78E-01	1.00E+00	9.32E-01
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	3	0.54	2.94	8.96E-01	1.00E+00	9.32E-01
Tryptophan Metabolism	60	3	0.57	2.94	8.98E-01	1.00E+00	9.32E-01
Glutathione Metabolism	21	4	0.47	2.94	9.17E-01	1.00E+00	9.32E-01
Vitamin B6 Metabolism	20	3	0.48	2.94	9.17E-01	1.00E+00	9.32E-01
Pantothenate and CoA Biosynthesis	21	4	0.55	2.94	9.20E-01	1.00E+00	9.32E-01
Ubiquinone Biosynthesis	20	1	0.02	2.94	9.32E-01	1.00E+00	9.32E-01
Methylhistidine Metabolism	4	1	0.02	2.94	9.32E-01	1.00E+00	9.32E-01

Tableau VII. Détail de la sélection des fœtus du modèle TPMP pour les analyses de western blot

Groupe maternel	Identifiant de la mère	Fœtus (n)	Identifiant des fœtus	Sexe	Poids fœtal (g)	Mode de sélection	Fœtus choisis
CTRL	6	6	6D2	F	0.8472		
			6D1	F	0.9775		6D1
			6D3	F	1.0270		
			6D4	M	1.0460		6D4
			6G1	F	1.0996		
			6G2	M	1.1507		
	7	9	7G2	M	0.8643		
			7G5	F	0.8976		7G5
			7G3	M	0.9062		
			7G4	M	0.9243		
			7D4	M	0.9522		7D4
			7D3	F	0.9915		
			7G1	F	1.0014		
			7D2	F	1.0460		
	7D1	F	1.0618				
	9	6	9D4	M	1.0788		
			9D6	F	1.0816		
			9D5	F	1.1272		9D5
			9D3	M	1.1309		
			9D1	M	1.1584		9D1
	9D2	M	1.3264				
	12	8	12G4	M	0.8992		
			12D3	F	0.9017		
			12D2	F	0.9061		
			12D1	F	0.9591		12D1
			12G2	M	0.9727		
			12D4	F	0.9970		
			12G1	M	0.9977		12G1
			12G3	F	1.0070		
	14	6	14G3	M	0.5836		
			14G5	F	0.7011		14G5
			14G4	F	0.7627		
			14G2	F	0.8466		
			14G1	M	0.8950		14G1
	14D1	M	1.0116				
	16	7	16D2	F	0.7771		
16D3			M	0.8038			
16D1			M	0.8752			
16D6			F	0.9122			
16D4			M	0.9280			
16G1			M	0.9510		16G1	
16D5	F	0.9744		16D5			
18	7	18G3	M	1.0472		18G3	
		18D3	F	1.0523			
		18D1	F	1.0616			
		18G1	F	1.0742			
		18G2	F	1.0977		18G2	
		18D4	F	1.1310			
		18D2	M	1.1509			
19	7	19G1	F	1.0360			
		19G4	F	1.0953		19G4	
		19G5	M	1.1065			
		19G2	M	1.1854			
		19G3	M	1.2180		19G3	
		19D1	M	1.2674			
		19D2	F	1.3170			

Groupe maternel	Identifiant de la mère	Fœtus (n)	Identifiant des fœtus	Sexe	Poids fœtal (g)	Mode de sélection	Fœtus choisis							
OB	22	7	22G2	F	0.7229									
			22D3	F	0.8267									
			22D2	F	0.9896									
			22D4	M	0.9943		22D4							
			22D1	M	1.0069									
			22G3	F	1.0138		22G3							
			22G1	F	1.0538									
	27	8	27D3	M	0.6776									
			27D2	F	0.6871									
			27G2	F	0.7592									
			27D4	F	0.7987		27D4							
			27D5	M	0.8412		27D5							
			27G3	M	0.8538									
			27D1	F	0.8540									
			27G1	M	0.8604									
	29	8	29D2	F	0.6222									
			29D1	M	0.7767		29D1							
			29D3	F	0.8428									
			29G4	F	0.8445									
			29G3	M	0.8705									
			29G1	F	0.8740		29G1							
			29G2	M	0.8858									
			29D4	M	0.9770									
	31	9	31D2	M	0.8932									
			31G3	M	0.9104		31G3							
			31G1	F	0.9108									
			31D5	F	0.9476									
			31D3	M	0.9670									
			31G2	F	0.9682		31G2							
			31D4	M	0.9781									
			31D1	M	1.0085									
			31D6	M	1.0447									
	32	7	32D4	M	0.4065									
			32D2	F	0.5593									
			32G2	M	0.6157		32G2							
			32D3	F	0.6476		32D3							
			32G1	F	0.7540									
	32D1	F	0.8259											
								32D5	M	0.9119				
								64	9	64D1	F	0.6164		
										64G5	M	0.7072		64G5
										64G1	M	0.7466		
										64D4	F	0.7730		
	64D2	M	0.7733											
	64D3	M	0.7919											
	64G2	M	0.8163											
	64G4	F	0.8565		64G4									
	64G3	F	0.8826											
	79	7	79G2	M	0.7557									
			79G4	M	0.8550		79G4							
79G3			M	0.8929										
79D2			F	0.9175										
79D1			M	0.9518										
79G1			M	0.9532										
79D3			F	1.0156		79D3								

Groupe maternel	Identifiant de la mère	Fœtus (n)	Identifiant des fœtus	Sexe	Poids fœtal (g)	Mode de sélection	Fœtus choisis
WL	28	9	28G2	F	0.7169		
			28G1	M	0.7484		
			28D1	F	0.7843		28D1
			28D2	M	0.8536		
			28D5	F	0.9220		
			28D3	M	0.9247		28D3
			28G3	M	0.9261		
			28D4	M	0.9567		
			28G4	M	1.0344		
	41	8	41D4	F	0.8149		
			41D2	F	0.8550		
			41G1	F	0.9064		41G1
			41D3	M	0.9242		41D3
			41G2	M	0.9520		
			41G3	M	0.9542		
			41D1	M	0.9869		
			41G4	F	1.0528		
	42	9	42G2	F	0.8756		
			42G1	M	0.9392		
			42G4	M	0.9727		42G4
			42G6	F	0.9791		42G6
			42D2	M	0.9888		
			42G5	F	0.9978		
			42D1	F	0.9982		
			42G3	F	1.0015		
			42D3	F	1.0484		
	51	8	51G1	M	0.9295		51G1
			51G5	F	0.9586		
			51G3	F	1.0173		
			51G2	F	1.0178		
			51G4	F	1.0178		
			51D3	F	1.0338		51D3
			51D1	M	1.0441		
			51D2	F	1.0794		
	59	9	59D4	F	0.8235		
			59G3	F	0.9085		
			59D3	F	0.9868		59D3
			59D2	F	1.0238		
			59D6	M	1.0266		59D6
			59D1	F	1.0323		
			59G1	F	1.0469		
			59G2	M	1.0518		
			59D5	M	1.1273		
	62	9	62G2	M	0.8666		
			62D4	M	0.8712		
			62G3	F	0.9187		
			62D3	F	0.9381		62D3
			62D5	M	0.9631		62D5
			62D1	F	0.9758		
			62D6	F	0.9820		
62D2			M	1.0059			
62G1			F	1.0145			
76	9	76G5	M	0.9550			
		76D2	F	0.9812			
		76G1	F	0.9830			
		76D1	F	1.0087			
		76D3	M	1.0421		76D3	
		76D4	F	1.0486			
		76G4	F	1.0764		76G4	
		76G2	F	1.0805			
		76G3	M	1.0984			
80	8	80G2	M	0.8960			
		80D2	M	0.9529			
		80D4	M	0.9921		80D4	
		80G4	F	1.0591			
		80G1	F	1.0667		80G1	
		80D3	F	1.1158			
		80D1	M	1.1260			
		80G3	M	1.1326			

Le code couleur est le suivant : Fœtus ayant le poids le plus élevé ou le plus faible de leur portée en gris ; Fœtus choisi par défaut en vert ; Fœtus choisi par tirage au sort en orange ; Echantillon inutilisable en rouge ;

CTRL - contrôle ; OB - obèse ; WL - perte de poids ; F - femelle ; M - mâle

## Protocole III. Extraction des histones de foies fœtaux de souris du projet TPMP

Préparer le tampon hypotonique :

- 10 mM Tris HCl pH 8 →
- 1 mM KCl →
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> →

Pour 10 ml de tampon hypotonique :

- 100 µl Tris HCl 1 M pH8
- 10 µl KCl 1 M
- 15 µl MgCl<sub>2</sub> 1 M
- + H<sub>2</sub>O MiliQ qsp 10 ml

Ajouter extemporanément :

- DTT 1,23 mM final →
- PiC 12,3 µl/ml final →
- PMSF 1,23 mM final →

Pour 1 ml de tampon de lyse :

- 1,23 µl
- 12,3 µl
- 12,3 µl
- + Tampon hypotonique qsp 1 ml (974,2 µl)

### ○ Isolement des noyaux ! Travailler sur glace

**Jour 1** (Ne pas oublier de préparer le matin les tubes pour les transferts)

- Re suspendre la poudre dans 500 µl de tampon de lyse et homogénéiser avec un Dounce à 4°C (15 allers/retours).
- Transférer la suspension dans un nouveau tube de 1,5 ml (utiliser pipette Pasteur ouverte stérilisée).
- Rincer les parois du dounce et le mortier avec 500 µl de tampon de lyse et transférer dans le tube contenant le lysat.
- Lavage du dounce et du mortier entre chaque échantillon : eau du robinet 2 fois, eau distillée 2 fois et tampon de lyse, en faisant des va et viens avec le mortier (attention à ne pas mettre trop de liquide dans le dounce : risque d'éclatement).
- Incuber 30 minutes à 4°C sur roue.
- Centrifuger 10 minutes à 10 000 g à 4°C pour culoter les noyaux.
- Eliminer le surnageant à la pipette et resuspendre les noyaux dans 400 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 N (=0,2 M) (Solution d' H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pur = 35,5 N ou 17,75 M)(2,2 ml d'acide + H<sub>2</sub>O MiliQ qsp 200 ml). Ne pas laisser de morceaux, utilisation du vortex possible.
- Incuber à 4°C sur roue Over Night (ou bien minimum 30 minutes).

**Jour 2**

- Centrifuger 10 minutes à 16 000 g à 4°C pour culoter les débris nucléaires.
- Transférer le surnageant dans des tubes de 1,5 ml neufs (attention au culot).

### ○ Précipitation des histones ! Travailler à 4°C ou sur glace

- Ajouter 140 µl de TCA goutte à goutte et mélanger immédiatement en retournant le tube plusieurs fois. (TCA 100% → 5 g TCA poudre + 2,27 ml H<sub>2</sub>O MiliQ). La solution doit devenir laiteuse.
- Incuber au moins 30 minutes dans la glace (ou Over Night à 4°C).
- Centrifuger 10 minutes à 16 000 g à 4°C pour culoter les histones (culot sous forme de smear sur la paroi du tube).
- Eliminer le surnageant à la pipette.

- Laver avec 500µl d'acétone froid (glace ou 4°C) en versant doucement l'acétone pour ne pas casser ni décoller le culot. Puis centrifuger 5 minutes à 16 000 g à 4°C.
- Effectuer un second lavage comme indiqué précédemment suivi d'une centrifugation identique à la précédente.
- Eliminer l'acétone au maximum, doucement, en faisant attention au culot et laisser sécher sous la hotte à température ambiante (environ 5-10 minutes).
- Re suspendre le culot dans 110 µl de PBS 1X. Possibilité d'ajouter du PBS pour faciliter la re suspension. Si le culot est résistant il est possible de vortexer jusqu'à re suspension complète.
- Stocker à -20°C pour une courte durée. Stocker à -80°C pour une plus longue durée.

## Protocole IV. Western blot utilisant le système de transfert semi-sec

### 1. Préparation des échantillons

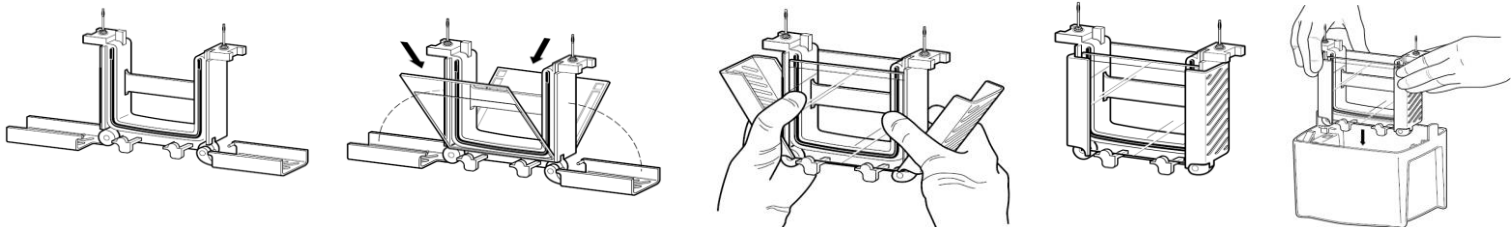
- Décongeler les échantillons sur la glace.
- Diluer les échantillons pour obtenir une concentration finale  $C = 0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de la façon suivante :
  - Extrait total d'histones :  $2\mu\text{g}$   $V_f=20\mu\text{l}$
  - Laemli Loading Buffer ou tampon de réduction (ne pas oublier d'ajouter le 2-mercaptoethanol extemporanément) afin d'obtenir une concentration finale  $C = 0,5X$
  - $\text{H}_2\text{O}$  milliQ qsp  $20\mu\text{l}$ 
    - Chauffer 10 min à  $80^\circ\text{C}$  ou 5 min à  $100^\circ\text{C}$  pour dénaturer les protéines.
    - Centrifuger brièvement pour faire tomber la condensation
    - Garder sur la glace ou à  $-20^\circ\text{C}$

### 2. Electrophorèse ou migration (gel precast)

- Préparer le tampon de migration de la façon suivante :

	1/2 gels	3/4 gels
<b>Tampon de Migration WB 10X</b>	50 mL	100 mL
<b>(Si tampon de WB fait au labo) SDS</b>	5 mL	10 mL
<b>10%</b>		
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math> milliQ</b>	qsp 500 mL	qsp 1L

- Placer les cassettes des gels dans le dispositif, peignes vers l'intérieur en ayant pris soin d'enlever la bande au bas du gel.



- A l'intérieur de la chambre ainsi formée, déposer un peu de tampon d'électrophorèse, vérifier l'absence de fuite. Ajouter le reste du tampon en laissant déborder dans la cuve.
- Enlever les peignes.
- Charger les gels avec  $2\mu\text{g}$  d'échantillon (normalement  $15\mu\text{L}$ ). Réserver un puits minimum pour ajouter l'échelle de poids moléculaire (ColorBurst)
- Mettre le couvercle et le brancher sur le générateur.
- Les paramètres de la migration ont les suivants :

- **Voltage max : 200 V**
- **Résistance : 25 mA par gel**

- Laisser migrer jusqu'à ce que le bleu atteigne le bas du gel ( $\approx 40$  minutes)

*On peut marquer le gel en bleu de Coomassie pour voir les protéines : incubé 30 min avec le bleu de Coomassie sur plaque orbitale, puis laver avec la solution de décoloration 2 minutes sous agitation pour 3 fois 30 minutes, en changeant la solution de décoloration entre chaque lavage. (Solution de coloration et décoloration à jeter dans les bidons Liquides Acides (orange) UN 3265.*

### 3. Transfert semi-sec

- Préparer (si nécessaire) le tampon de transfert en suivant les instructions sur la bouteille
- Humidifier et équilibrer les compresses de transfert en les plaçant 2-3 minutes dans du tampon de transfert
- Activer la membrane de PVDF dans du méthanol 100% jusqu'à ce que la membrane soit translucide
- Équilibrer la membrane en la plaçant 2-3 minutes dans 30ml de tampon de transfert
- La borne + correspond au bas de la cassette de transfert (fig.7). Placer dans cet ordre (de bas en haut) les composants du sandwich : compresse de transfert, membrane, gel de migration (le placer dans le sens dans lequel on veut visualiser la membrane), compresse de transfert. Penser à éliminer les bulles d'air à l'aide du rouleau.

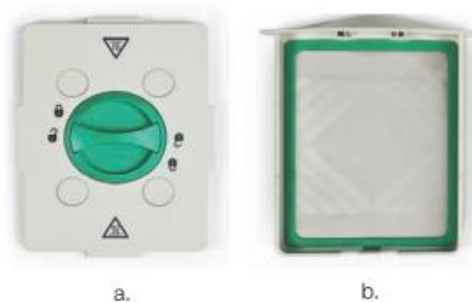


Fig. 7. Open cassette. **a.** Lid with cathode (-) on the underside. **b.** Base with anode (+).

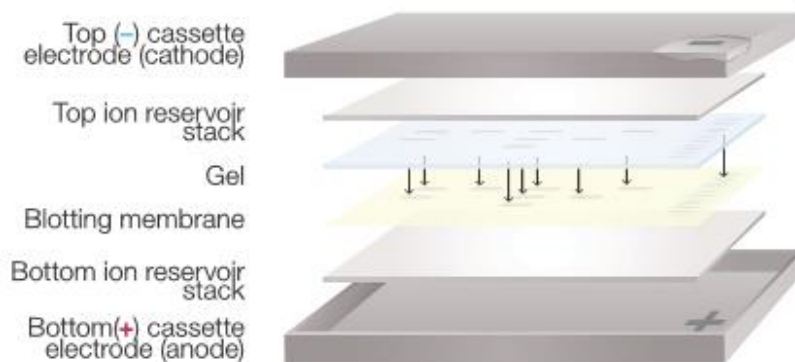


Fig. 8. Proper layering of the assembled transfer pack.

- Fermer la cassette et la verrouiller à l'aide de la molette.
- Placer la cassette dans l'appareil Trans-Blot Turbo.
- Sélectionner le programme Turbo à l'aide du clavier et choisir le nombre et la taille des gels à transférer puis lancer le transfert, durée = 7 minutes.
- A la fin du transfert retirer la cassette (attention peut être chaude) et l'ouvrir puis placer rapidement la membrane dans du PBST pour la conserver humide.



#### 4. Blocage

- Préparer le PBS-Tween 0,1% + lait à 5% ou BSA à 5% (selon les anticorps) : agiter pour bien dissoudre.
- Pour la BSA 5% il est préférable de filtrer la solution
- Recouvrir la membrane de PBST-Lait 5%
- Incuber 1h à température ambiante sous agitation douce

#### 5. Anticorps Primaire

- Préparer l'anticorps primaire à la dilution requise dans du PBST-Lait 5% ou BSA 5% en fonction des recommandations
- Incuber en suivant les recommandations
- Effectuer un lavage rapide dans du PBST 0,1% suivi de 3 x 20 minutes (ou 6 x 10 minutes) de lavage sous agitation douce en changeant le PBST entre chaque lavage.  
H3 Total → Incubation 1h à RT, dilution 1/10.000 dans PBST-Lait 5%.

#### 6. Anticorps secondaire

- Préparer l'anticorps secondaire à la dilution requise dans du PBST-Lait 5% ou BSA 5% en fonction des recommandations
- Incuber en suivant les recommandations
- Effectuer un lavage rapide dans du PBST 0,1% suivi de 3 x 20 minutes (ou 6 x 10 minutes) de lavage sous agitation douce en changeant le PBST entre chaque lavage.  
 $\alpha$ IgG Rabbit → Incubation 1h à RT, dilution 1/10.000 dans PBST-Lait 5%.

#### 7. Révélation

- Si les réactifs sont stockés au frais, les sortir 1h avant la révélation.
- Préparer pour une petite membrane 5ml de solution de révélation en mélangeant les deux solutions dans un ratio 1 : 1.
- Faire couler la solution de révélation sur la membrane en évitant les bulles et laisser incuber 5 minutes.
- Egoutter la membrane et l'envelopper dans du Saran pour éviter qu'elle ne sèche. Attention à ne pas faire de bulles ou de plis sur le Saran ce qui pourrait gêner l'acquisition du signal.
- Pour révéler avec le Chemidoc , penser à mettre un papier blanc en dessous du papier pour avoir un bon contraste.

## Protocole V. CHIP-seq, basé sur le protocole utilisé au département des Sciences Animales de l'Université de Davis

### Préparation des tissus

Protocole basé sur le protocole « Diagenode iDeal ChIP-seq kit for Histones » ou « for Transcription Factors »

#### Solutions à utiliser :

**Tampon de Lyse** : Buffer iL2 et iL2 du kit

**Tampon de cisaillement** : Tampon iS1 du kit. Ajouter de l'inhibiteur de protéase (fourni dans le kit) extemporanément. A refroidir sur glace avant usage.

**Tampon TE** : Tris-EDTA 1X

**PBS** : Ajouter de l'inhibiteur de protéases avant usage.

**Pierce™ Methanol-free Formaldehyde Ampules, Thermo Scientific – 16% Formaldehyde (w/v), Methanol-Free 28906. Ne pas utiliser de PFA.**

#### Préparation des tissus (temps dépend du tissu) et Cross-Linking (~2h)

Sous hotte : préparer le formaldéhyde 1% à partir du formaldéhyde 16%

→ **Formaldéhyde (16%) 62,5 µl + 937,5 µl PBS (avec inhibiteur de protéases)**

1. Broyer les tissus dans de l'azote liquide. Et transférer la poudre dans des tubes de 2 mL préalablement annotés
2. Ajouter rapidement **1 ml de Formaldéhyde 1%** (1 ml pour 30mg de tissu en général. Jusqu'à 300mg pour du tissu adipeux et 15 mg pour du tissu musculaire). Inverser le tube plusieurs fois immédiatement après l'ajout.
3. Incuber le tube à température ambiante sur rotateur/roue pendant **8 minutes** (ce temps peut varier en fonction du type cellulaire, une optimisation peut être nécessaire).
4. Stopper le crosslinking en ajoutant **100 µl de glycine (contenue dans le kit)** et incuber le tube sur roue pendant **10 minutes**.
5. Centrifuger à **2000g** pendant **10 minutes** à **4°C** pour culotter les tissus.
6. Eliminer le surnageant et ajouter **1 ml de PBS+PI** refroidi sur glace. Remuer le tube en le heurtant d'un doigt plusieurs fois pour décrocher le culot. Si le culot a du mal à se décrocher, mettre le tube à l'horizontale et recommencer.
7. Culotter les tissus en centrifugeant à **2000g** pendant **10 minutes** à **4°C**.
8. Eliminer le surnageant et ajouter **1 ml de PBS+PI** refroidi sur glace. Remuer le tube en le heurtant d'un doigt plusieurs fois pour décrocher le culot. Si le culot a du mal à se décrocher, mettre le tube à l'horizontale et recommencer.
9. Culotter les tissus en centrifugeant à **2000g** pendant **10 minutes** à **4°C** et éliminer le surnageant.

Le culot de tissu crosslinké peut ensuite être refroidi dans de l'azote liquide pour ensuite être stocké à -80°C si nécessaire.

Il est néanmoins conseillé de continuer le protocole sans cette étape de congélation.

#### Extraction de Chromatine et Cisaillement

10. Resuspendre le culot de tissu dans **1,5 ml de iL1 Buffer** en tapotant du doigt.

11. Incuber le tube sur glace pendant **20 minutes**. (*Cette incubation sert à faire gonfler les cellules pour permettre la lyse mécanique, tout en laissant les noyaux intacts.*)
12. Transférer le tissu en suspension dans un **dounce** préalablement refroidi et homogénéiser en faisant **30-40 aller-retour** de pilon. **Garder les échantillons froids.**
13. Transférer l'homogénat dans **un tube neuf de 2 ml** (ou 5 ml en fonction du tissu) puis rincer le dounce avec **500 µl de iL1 Buffer** et combiner avec le tube de 2 ml.
14. Culoter les noyaux en centrifugeant à **2000g** pendant **5 minutes** à **4°C**. (*Ce culot ne sera pas collé au tube autant que le premier et sera principalement blanc.*)
15. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans **2 ml de iL2 Buffer**. Incuber sur glace pendant 20 minutes.  
Pendant l'incubation, préparer le tampon **iS1 Buffer** (ajout d'inhibiteur de protéases et refroidissement sur glace).
16. Culoter les noyaux en centrifugeant à **2000g** pendant **5 minutes** à **4°C**.
17. Eliminer le surnageant et resuspendre dans **660µl de iS1 Buffer**. (*Le volume de tampon va dépendre du type de sonicateur.*)
18. Incuber le tube dans la glace pendant **20 minutes**.
19. Prélever un **aliquote de 5µl** de chaque échantillon et le diluer dans **15 µl de TE 1X** pour un gel analytique. Conserver les aliquotes dans la glace jusqu'à utilisation. Ces aliquotes sont là pour confirmer que la chromatine était intacte avant sonication.
20. **Protocole de sonication dépendant de l'appareil utilisé.**
21. Une fois la sonication complète, enlever les échantillons du sonicateur et les conserver dans la glace.
22. Prélever un aliquot de **5 µl** de chaque tube soniqué et les diluer dans **45µl de TE 1X** pour un gel analytique.
23. Traiter les aliquots par **20 µg (2µl) de Proteinase K** pendant **30 minutes** à **65°C** puis traiter à la **RNase A (2µl (10mg/ml))**.  
Ou ajouter **6 µl de NaCl 5M** aux 50 µl et incuber **30 minutes** à **95°C**.  
Ces étapes servent à dégrader protéines et ARNs dans le premier cas ou forcer le décrosslinking dans le second cas. Si la seconde méthode est choisie, une bande au niveau des puits peut être visible, il s'agit des protéines qui n'ont pas été dégradées.
24. Prélever **10 µl** et ajouter un colorant de charge à chacun des échantillons puis les faire migrer sur un gel **d'agarose 1,5%** dans du tampon **TAE 1X**.
25. Visualiser les échantillons d'ADN sur le gel d'agarose. (**La Chromatine cisailée doit se trouver dans une fourchette de taille de 200 à 500 pb.**)
26. A ce point, il est possible de congeler et stocker à **-80°C** les échantillons soniqués pour une utilisation ultérieure (cf. Protocole IP).  
Si l'utilisation est dans peu de temps, il est possible de les conserver à **-20°C**.
27. Pour chacun des aliquotes de chromatine soniquée précédemment constitués, ajouter **54 µl de TE 1X** ( $V_f=100\mu l$ ). Nettoyer et concentrer les acides nucléiques à l'aide de **Qiagen Minelute PCR purification kit**. Eluer dans **10 µl** à l'étape finale.
28. Mesurer la concentration grâce au Nanodrop et estimer la concentration initiale de la chromatine soniquée. Cette concentration sera utilisée pour les calculs nécessaires à l'ImmunoPrécipitation.

Analyser ensuite **1 µl** sur **Bioanalyzer HS chip** afin de vérifier la distribution des fragments et être sûr d'avoir une taille correcte. Vérifier quel nombre de cycle est le bon, et si besoin faire des cycles additionnels sur les échantillons pas assez fragmentés.

## Immunoprécipitation de la chromatine

Le protocole est réalisé à partir de l'étape 3 du protocole du fabricant. Le kit utilisé est le iDeal ChIP-seq Kit for Histones de Diagenode. Protocole optimisé pour 1M cellules par ChIP (7,4mg foie souris <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930941>)

Le protocole original est modifié pour faire une première incubation de la chromatine et des anticorps sur la nuit, sans les billes pour s'assurer d'une bonne fixation des anticorps à la chromatine.

L'ADN doit être quantifié après le cisaillement des tissus, sur une partie traitée à la RNase et Proteinase K ou au NaCl 5M (cf. protocole de Tissue Shearing). La quantité d'ADN de départ est de **1,5 µg par IP**. Faire en sorte d'avoir cette quantité dans **105 µl total**. **100 µl** seront utilisés pour l'**IP** et le **reste** pour l'**INPUT**.

### J1

1. Préparer un Premix contenant pour chaque IP :
  - BSA 5%                    6 µl
  - PI (200X)                1,5 µl
  - iC1 Buffer (5X)        60 µl
  - Anticorps                x µl (dépend de l'anticorps et de sa concentration)
  - H<sub>2</sub>O                        qsp 200 µl (132,5-x)
2. Mélanger **200µl de Premix** à **100 µl de chromatine fragmentée** pour chaque IP.
3. Incuber les tubes **O/N** à **4°C** sur une **roue à 40 rpm** (au minimum 9h).

### J2

4. Préparation des billes magnétiques **DiaMag Protein A-coated magnetic beads** :
  - Le volume de billes à préparer est de 20 µl / IP
  - Diluer le **5X ChIP buffer iC1** avec de l'eau qualité ChIP-seq (fournie ?), **Cf = 1X**.
  - Pour chaque IP, **180µl de buffer iC1** sont nécessaires.
  - Placer ensuite le **buffer iC1** dans la glace.
5. Laver les billes à **quatre reprises** avec **2 fois** leur volume de **1X ChIP buffer iC1** :
  - Ajouter aux billes le **buffer iC1**.
  - Mélanger à la pipette par plusieurs va et viens pour resuspendre les billes.
  - Placer les tubes sur un portoir magnétique (Diagenode magnetic rack) et attendre **au moins une minute**.
  - Eliminer le surnageant et recommencer **3 fois** les étapes de lavage.
  - Resuspendre les billes dans leur volume initial (**20 µl/IP**).
6. Prélever **20 µl** de billes et les transférer dans chacun des tubes d'IP. Incuber pendant **2 heures, sur roue, à 4°C**. Il est possible de laisser incuber plus longtemps, mais attention à ne

pas reprendre la manip trop tard (avant 15h de préférence) pour avoir le temps de faire la suite et lancer l'incubation O/N suivante assez tôt.

Les étapes suivantes sont à réaliser à 4°C, privilégier la manip en chambre froide, ou sur glace si les portoirs magnétiques sont adaptés.

7. Centrifuger brièvement les tubes pour rassembler le liquide puis les disposer sur le portoir magnétique pendant au moins une minute. Une fois les billes rassemblées, éliminer le surnageant.
8. Ajouter à chaque tube **350 µl** de **wash buffer iW1**. Vortexer légèrement les tubes ou les remuer à la main pour resuspendre les billes puis incuber **sur roue pendant 5 minutes** (toujours à 4°C).
9. Répéter les lavages comme indiqué ci-dessus (étapes 7 et 8) une fois avec chacun des tampons de lavages **Wash buffer iW2, iW3 et iW4** en utilisant **le même volume de tampon**.
10. Après avoir éliminé le dernier tampon de lavage, ajouter **103 µl** d' **Elution buffer iE1** aux billes et incuber **30 minutes sur roue à température ambiante**. Pendant cette incubation, préparer des tubes annotés et contenant **4 µl** de **Elution buffer iE2**.
11. Centrifuger brièvement les tubes et les placer dans sur un portoir magnétique. Attendre que les billes se soient regroupées puis transférer **100µl** du surnageant dans un nouveau tube contenant 4µl de **buffer iE2**.  
Ajouter **99 µl** de **buffer iE1** et **4 µl** de **buffer iE2** à **1 µl** d'**INPUT**.  
Incuber **O/N** à **65°C** avec **agitation**.

### **J3**

Penser à sortir les réactifs/solutions et faire décongeler sur glace. L'isopropanol doit être à RT. Les billes (**IPure Beads v2**) doivent être conservées sur glace (pour éviter qu'elles sèchent) et vortexées avant chaque utilisation.

12. Pooler les échantillons si nécessaire. 2 échantillons peuvent facilement être poolés. Si plus de 2 échantillons doivent l'être, procéder à la purification de chaque échantillon individuellement, pooler les éluats à la fin de la purification et concentration iPure.
13. Ajouter **2 µl** de **carrier** à chaque IP et INPUT.
14. Ajouter **100 µl d'isopropanol 100%** à chaque IP et INPUT et inverser les tubes plusieurs fois pour mélanger. La solution peut devenir trouble, cela n'a pas d'incidence sur la qualité ou la quantité d'ADN purifié.

15. Resuspendre les billes fournies (**IPure Beads v2**) et transférer **10 µl** dans chaque IP et INPUT. Placer les tubes sur roue/rotateur au fur et à mesure. Déclencher le chronomètre après le dernier tube et incubé à **RT** pendant **10 minutes** sur roue à **40 rpm**.

**Pendant l'incubation :** préparer et annoter les tubes qui recevront l'ADN (point 21).  
Préparer les **Wash buffer 1** et **2** contenant **50%** d'isopropanol (1 volume de wash buffer pour un volume d'isopropanol 100%)  
Ne jamais laisser les bouteilles ouvertes pour éviter l'évaporation.

16. Vortexer légèrement (puissance 2-3) les tubes puis les centrifuger pour rassembler le liquide. Placer ensuite les tubes sur le portoir magnétique. Attendre 1 minute, les billes doivent s'être rassemblées, puis éliminer le surnageant.

17. Fermer les tubes (pour éviter l'évaporation) et les retirer du portoir magnétique.  
Ajouter **100 µl** de **Wash buffer 1** par tube puis vortexer pour remettre les billes en suspension (ou les placer sur rotateur en attendant l'incubation) puis centrifuger rapidement pour rassembler le liquide et incubé 1 minute sur la paillasse à RT (dans protocole Diagenode, 5 minutes sur roue à 40 rpm).

18. Centrifuger rapidement les tubes pour rassembler le liquide si nécessaire puis les placer sur portoir magnétique, attendre au moins 1 minute et éliminer le surnageant.  
Fermer les tubes et les retirer du portoir magnétique.  
Ajouter **100 µl** de **Wash buffer 2** par tube.  
Vortexer ensuite les tubes pour remettre les billes en suspension (ou les placer sur rotateur en attendant l'incubation) puis centrifuger rapidement pour rassembler le liquide et incubé 1 minute sur la paillasse à RT (dans protocole Diagenode, 5 minutes sur roue à 40 rpm).

19. Centrifuger rapidement les tubes pour rassembler le liquide si nécessaire puis les placer sur portoir magnétique, attendre 1 minute et éliminer le surnageant. Centrifuger de nouveau les tubes et les remettre sur portoir magnétique puis enlever le reste de Wash buffer 2 si nécessaire.

20. Resuspendre les billes avec **55 µl** de **Buffer C**, mélanger à la pipette (5-6 va et viens) et incubé à **température ambiante** sur roue à **40 rpm** pendant **15 minutes** (déclencher le chronomètre après avoir placé le dernier tube sur la roue).

**Pendant l'incubation :** Préparer tubes et réactifs pour quantification QBit.

21. Centrifuger les tubes pour rassembler le liquide et les placer sur portoir magnétique. Attendre 1 minute et transférer **52 µl** de surnageant dans de nouveaux tubes placés dans la glace. Puis à l'aide d'une P2 prélever **2 µl**.  
Centrifuger de nouveau les tubes contenant les billes et les replacer sur portoir magnétique, essayer de récupérer le reste de liquide, sans aspirer de billes, à l'aide d'une P2. Les tubes

contenants les billes peuvent ensuite être jetés.

22. Prélever **2  $\mu$ l** d'ADN ImmunoPrécipité et les mettre dans les tubes préalablement préparés pour la quantification au QBit. Ne pas les diluer, la concentration est généralement faible à cette étape [0,1 à 1 ng/ $\mu$ l]

Les échantillons peuvent être stockés à -20°C.



## Préparation des librairies pour le séquençage

Basé sur le protocole de : NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®

Matériel de départ :

500 pg – 1 µg d'ADN fragmenté, de préférence essayer de normaliser la quantité d'ADN de chaque échantillon.

Le volume doit être de 50 µl pour chaque échantillon. Si ce n'est pas le cas, ajuster à 50 µl avec du TE 0.1X.

Vortexer rapidement et déposer 50 µl dans un tube a PCR stérile annoté

### 1. NEBNext End Prep (réparation des extrémités d'ADN).

1.1 Faire un prémix de 3 µl de NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix et 7 µl de NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer pour chaque échantillon à traiter.

Mixer a la pipette en faisant 5-6 allers-retours, prélever 10 µl et les ajouter aux 50 µl d'ADN fragmente.

Volume total = 60 µl

1.2 Régler une pipette 100 ou 200 à 50 µl et faire aux moins 10 allers-retours pour bien mélanger. Puis centrifuge rapidement sur la centri de paillasse pour récupérer tout le liquide. **Il est important de bien mixer. La présence d'une petite quantité de bulles n'a pas d'importance.**

1.3 Préchauffer le couvercle du thermocycleur a au moins 75°C, puis placer les tubes dedans et lancer le programme suivant :

30 minutes à 20°C

30 minutes à 65°C

Hold at 4°C(ne pas laisser les tubes trop longtemps)

Préparer les étapes suivantes pendant le temps d'incubation.

### 2. Ligation des adaptateurs.

2.1 En fonction de la quantité initiale d'ADN diluer le NEBNext Adaptor for Illumina comme indique dans le tableau ci-dessous :

INPUT	ADAPTOR DILUTION (VOLUME OF ADAPTOR: TOTAL VOLUME)	WORKING ADAPTOR CONCENTRATION
1 µg–101 ng	No Dilution	15 µM
100 ng–5 ng	10-Fold (1:10)	1.5 µM
less than 5 ng	25-Fold (1:25)	0.6 µM

2.2 Ajouter les composants suivants directement à la Mixture de End Prep Reaction :

End Prep Reaction Mixture (Step 1.3 in Section 1)	60 µl
● (red) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix*	30 µl
● (red) NEBNext Ligation Enhancer	1 µl
● (red) NEBNext Adaptor for Illumina**	2.5 µl
<hr/>	
Total volume	93.5 µl

Bien mélanger le Ultra II Ligation Master Mix a la pipette avant de l'ajouter.  
Mélanger les Adaptateurs pour Illumina par 3-4 va et viens a la pipette avant ajout.  
Il est possible de faire un Pre-Mix de NEBNext Ultra II Ligation Master Mix + NEBNext Ligation Enhancer.

Ce Pre-Mix est stable pendant au moins 8h à 4°C.

Ne pas ajouter les Adapteurs dans ce mix.

2.3 Régler une pipette 100 ou 200 à 80 µl et bien mélanger a la pipette (au moins 10 va et viens) suivi d'une centrifugation rapide pour collecter tout le liquide.

**Attention le mix de ligation est très visqueux. Un mélange adéquat de la réaction de ligation est nécessaire sans quoi la ligation risque d'être moins efficace.**

2.4 Incuber à 20°C pendant 15 minutes dans un thermocycleur sans faire chauffer le couvercle. Pendant ce temps préparer les tubes 1,5ml avec les billes 40 et 20 (3.A.2 et 3.A.6) et préparer de l'éthanol 80% frais.

2.5 Ajouter 3 µl de USER Enzyme au mix de ligation après incubation.

2.6 Bien mélanger et incuber a 37°C pendant 15 minutes avec le couvercle chauffe a au moins 47°C.

**Les étapes 2.5 et 2.6 sont nécessaires uniquement si on utilise les NEBNext Adaptors.**

**Possible pause dans le protocole en stockant les échantillons à -20°C O/N (mais préférable de continuer la manip tout du long).**

### 3. Sélection de taille et nettoyage des Adapteurs

**Le protocole est fait ici indépendamment de la quantité d'ADN en input alors que dans le protocole, pour un input <50ng il n'est pas recommandé de faire de sélection de taille (étapes 3.B dans le protocole du fabricant, pas détaillé ici).**

#### 3.A

Différents types de billes peuvent être utilisés a cette étape, SPRIselect, NEBNext Sample Purification Beads ou AMPure XP Beads. A Davis utilisation des AMPure XP Beads, penser à les sortir au moins 30 minutes avant du frigo pour les réchauffer a température ambiante.

Table 3.1 : Conditions recommandées pour la sélection de taille.

LIBRARY PARAMETERS	APPROXIMATE INSERT SIZE	150 bp	200 bp	250 bp	300-400 bp	400-500 bp	500-700 bp
	Approx. Final Library Size (insert + adaptor + primers)	270 bp	320 bp	370 bp	480 bp	600 bp	750-800 bp
BEAD VOLUME TO BE ADDED ( $\mu$ l)	1st Bead Addition	50	40	30	25	20	15
	2nd Bead Addition	25	20	15	10	10	10

3.A.1 Bien vortexer les billes avant usage (5-6 fois rapidement)

3.A.2 Transférer la réaction de ligation dans les tubes contenant les 40  $\mu$ l de billes. Bien mélanger à la pipette par au moins 10 va et viens. Vérifier que tout le liquide a été éjecté. Possible de vortexer légèrement en supplément. Centrifuger ensuite rapidement les tubes pour rassembler tout le liquide (ne pas centrifuger longtemps pour éviter la précipitation des billes).

3.A.3 Incuber les échantillons pendant au moins 5 minutes a température ambiante

3.A.4 Placer les tubes sur un portoir magnétique (si nécessaire, il est possible de centrifuger rapidement pour rassembler tout le liquide avant de placer sur le portoir).

3.A.5 Après 5 minutes (ou lorsque la solution est claire), transférer avec précaution le surnageant (dans lequel se trouvent les petits fragments d'ADN) dans le tube contenant les 20  $\mu$ l de billes. (**Attention : ne pas éliminer le surnageant**). Le tube contenant les billes peut être éliminé.

3.A.6 Mélanger a la pipette par une dizaine d'allers-retours, attention à bien éjecter tout le liquide après le dernier va et viens. Incuber ensuite 5 minutes a température ambiante. Juste après avoir déclenché le chronomètre, vortexer légèrement pour bien mixer (a puissance 2-3).

3.A.7 Placer les tubes sur un portoir magnétique pour séparer les billes du surnageant. Si nécessaire centrifuger rapidement les tubes avant de les placer sur le portoir magnétique pour rassembler tout le liquide.

3.A.8 Après 5 minutes (ou lorsque la solution est claire), éliminer avec précaution le surnageant (contient les très petits fragments d'ADN). Faire très attention à ne pas perturber les billes, qui contiennent nos brins d'ADN désirés. (**Attention : ne pas éliminer les billes**).

3.A.9 Ajouter 200  $\mu$ l d'éthanol 80% fraîchement préparé (pour éviter l'évaporation de l'éthanol) au tube contenant les billes, toujours sur le portoir magnétique. Incuber à température ambiante 30 secondes minimum (si un peu plus ce n'est pas grave).

Eliminer ensuite le liquide en s'assurant de ne pas perturber les billes (cône toujours à l'opposé des billes).

3.A.10 Répéter l'étape 3.A.9 une fois. Eliminer un maximum de liquide a la pipette, puis centrifuge rapidement pour rassembler tout le liquide. Replacer les tubes sur le portoir magnétique, lancer un chronomètre de 5 minutes et éliminer le reste de l'éthanol à la P10.

3.A.11 Laisser les billes sécher a l'air pendant les 5 minutes en laissant le capuchon des tubes ouvert, toujours sur le portoir magnétique.

**Attention : ne pas trop sécher les billes. Cela entraine une perte d'ADN. L'éluition doit être faite lorsque les billes sont encore de couleur marron foncé et avec un aspect brillant, mais tout le liquide visible doit s'être évaporé. Si les billes deviennent de couleur marron plus clair et commencent à "craquer" c'est qu'elles sont trop sèches.**

3.A.12 Enlever les tubes du portoir magnétique et éluer l'ADN cible avec 23 µl de TE 0.1X (possible d'utiliser du Tris-HCl 10mM, ou bien même de l'eau). Le volume d'éluition est plus grand que dans le protocole fabriquant afin d'avoir 20 µl pour l'étape 4.1.1.A et 3 µl supplémentaire comme sécurité pour ne pas prélever de billes.

3.A.13 Bien mélanger au vortex ou à la pipette par une dizaine de va et viens (plutôt à la pipette considérant le faible volume). Incuber 2 minutes à température ambiante (déclencher le chrono une fois le dernier tube mélange) et pendant ce temps faire un court coup de vortex a puissance 2-3, centrifuger rapidement pour rassembler tout le liquide. Annoter les tubes de PCR pour l'étape 4.1.1.A pendant ce temps.

3.A.14 Placer les tubes sur un portoir magnétique et incuber 5 minutes. Pendant ce temps, préparer les mix de PCR pour l'étape 4.1.1.A. Après 5 minutes (ou lorsque la solution est claire, ce n'est pas grave si plus long) transférer 20 µl dans les tubes de PCR préalablement préparés et annotés.

**La manip peut être mise en pause a cette étape, dans ce cas ne pas transférer l'éluât dans les tubes avec le mix mais dans des tubes neufs et conserver à -20°C.**

#### **4. Enrichissement de l'ADN ligationné aux adaptateur par PCR.**

##### 4.1 Amplification PCR

##### 4.1.1 Préparation des mixs de PCR

##### 4.1.1.A Dans le cas où les primers forward et reverse ne sont pas combines

Protocole adapté pour économiser des primers

4.1.1A. **Forward and Reverse Primer  
not already combined**

Adaptor Ligated DNA Fragments (Step 3.1.14 or 3.2.11)	15 µl	20 µl ADN
• (blue) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl	25 µl MasterMix
• (blue) Index Primer/i7 Primer*,**	5 µl	2.5 µl Index Primer
• (blue) Universal PCR Primer/i5 Primer*,***	5 µl	2.5 µl Universal PCR Primer
Total volume	50 µl	50 µl Total

Il est conseillé de faire un PreMix de PCR, déposer 30 µl dans chaque tube de PCR puis ajouter les 20 µl d'ADN. **Attention : les primers Index sont spécifiques de chaque librairie, ne pas en mettre dans le PreMix.**

Garder la liste des échantillons avec les numéros de librairies afin de s'assurer que le bon Index est utilisé pour chaque réaction.

4.1.2 Régler une P100 ou P200 sur 40 µl et faire au moins 10 va et viens pour bien mélanger le mix de PCR. Centrifuger rapidement pour rassembler tout le liquide.

4.1.3 Placer les tubes dans un thermocycleur et faire une amplification PCR selon ces conditions :

Le nombre de cycles va dépendre de la librairie à préparer.

Pour les INPUT suivre la Table 4.1

Pour les ChIP suivre la table 4.2

**Table 4.1**

INPUT DNA IN THE END PREP REACTION	# OF CYCLES REQUIRED FOR STANDARD LIBRARY PREP ~100 ng (30-100 nM)
1 µg*	3**
500 ng*	3**
100 ng*	3
50 ng	3-4
10 ng	6-7
5 ng	7-8
1 ng	9-10
0.5 ng	10-11

**Table 4.2**

INPUT DNA IN THE END PREP REACTION	# OF CYCLES REQUIRED FOR TARGET ENRICHMENT LIBRARY PREP (~1 µg)
1 µg*	3–4*, **
500 ng*	4–5*
100 ng*	6–7*
50 ng	7–8
10 ng	9–10
5 ng	10–11
1 ng	12–13
0.5 ng	14–15

Dans le cas des manip a Davis, 13 cycles sont fait pour s'assurer d'avoir une quantité d'ADN amplifiée suffisante pour le séquençage. Pendant ce temps, préparer les tubes contenant les billes pour l'étape 5.2.

**Possible de stopper la manip après l'amplification, avant le nettoyage. Dans ce cas, stocker les tubes à -20°C. Penser à les placer à 4°C, ou sur glace, pour les décongeler doucement avant le nettoyage. Mixer rapidement au vortex et centrifuger rapidement avant la poursuite du protocole.**

## 5. Nettoyage des réactions de PCR.

Différents types de billes peuvent être utilisées a cette étape, SPRIselect, NEBNext Sample Purification Beads ou AMPure XP Beads. A Davis utilisation des AMPure XP Beads, penser à les sortir au moins 30 minutes avant du frigo pour les réchauffer a température ambiante.

5.1 Vortexer fortement est assez longtemps les billes pour les remettre en suspension.

5.2 Transférer les 50 µl de réaction de PCR dans les tubes contenant les 45 µl de billes. Bien mélanger à la pipette par au moins 10 va et viens. S'assurer d'éjecter tout le liquide au dernier coup. Déclencher un chronomètre de **5 minutes** après avoir mélange le dernier tube, puis les vortexer à puissance 2-3 quelques secondes (entre 2 et 5) suivi d'une centrifugation rapide pour rassembler tout le liquide.

5.3 Laisser incuber 5 minutes a température ambiante puis vortexer rapidement a puissance 2-3 suivi d'une centrifugation rapide pour rassembler tout le liquide.

5.4 Placer les tubes sur un portoir magnétique pour séparer les billes du surnageant.

5.5 Après **5 minutes** (ou lorsque la solution est claire), éliminer le surnageant en faisant attention à ne pas perturber les billes contenant notre ADN cible. **Attention : ne pas éliminer les billes.**

5.6 Ajouter 200 µl d'éthanol 80% fraîchement préparé aux tubes sur le portoir

magnétique. Incuber à température ambiante au moins 30 secondes puis éliminer le surnageant en faisant attention à ne pas perturber les billes.

5.7 Répéter l'étape 5.6 pour un total de deux lavages. Eliminer un maximum de liquide à la pipette, puis centrifuge rapidement pour rassembler tout le liquide. Replacer les tubes sur le portoir magnétique, lancer un chronomètre de 5 minutes et éliminer le reste de l'éthanol à la P10.

5.8 Laisser les billes sécher à l'air pendant les 5 minutes en laissant le capuchon des tubes ouvert, toujours sur le portoir magnétique.

**Attention : ne pas trop sécher les billes. Cela entraîne une perte d'ADN. L'élution doit être faite lorsque les billes sont encore de couleur marron foncé et avec un aspect brillant, mais tout le liquide visible doit s'être évaporé. Si les billes deviennent de couleur marron plus clair et commencent à "craquer" c'est qu'elles sont trop sèches.**

5.9 Enlever les tubes du portoir magnétique et éluer l'ADN en ajoutant 53 µl de TE 0.1X.

5.10 Bien mélanger à la pipette en faisant au moins 10 va et viens ou utiliser un vortex, puis centrifuge rapidement pour rassembler tout le liquide. Incuber à température ambiante pendant **2 minutes**.

5.11 Placer les tubes sur un portoir magnétique et après 5 minutes (ou lorsque le liquide est clair) prélever 50 µl du surnageant et les placer dans un tube contenant 45 µl de billes.

Préparer les tubes contenant 45 µl de billes pendant l'incubation, préparer aussi des tubes de PCR pour recevoir l'ADN en fin de Nettoyage.

Refaire une fois le Nettoyage des amplifications de PCR en reprenant à la **phase 5.2** afin de s'assurer d'avoir éliminé tous les primers.

Le volume de TE 0.1X à ajouter pour l'élution est cette fois-ci de 45 µl.

5.12 Prélever 42 µl d'éluât et le transférer dans un nouveau tube de PCR préalablement annoté.

5.13 Vérifier la distribution des fragments d'ADN à l'aide d'une Puce ADN High Sensitivity sur Bioanalyzer d'Agilent. Pour cela prélever 2 µl de l'éluât, le disposer dans un nouveau tube de PCR contenant au moins 4 µl de TE 0.1X. Passer les librairies diluées au Qbit pour s'assurer de leur concentration, de préférence la concentration doit être inférieure à 20 ng/µl pour être utilisée dans le Bioanalyzer. Généralement les concentrations sont de l'ordre de 5-7 ng/µl pour les IP et de 10-12 ng/µl pour les INPUT.

Sur le Bioanalyzer le plus gros des pics doit être à la taille attendue des fragments

ex : ~300 pour librairie de 200pb+primers+adapteurs+index.

Si des fragments plus gros sont présents ce n'est pas grave tant que la molarité du grand pic leur est très supérieure.

Si le grand pic présente un gap c'est que l'échantillon analyse est trop concentré, ajouter quelques  $\mu\text{l}$  de TE 0.1X et repasser au Bioanalyzer.

Les librairies doivent être stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Possible de les conserver à  $-20^{\circ}\text{C}$  mais pas plus de 2 ou 3 jours.



## Pipeline d'analyses bioinformatiques (développé par le Dr. Colin Kern)

- Filtrage des bases et des adaptateurs de faible qualité en utilisant *trimGalore*
- Alignement des séquences en utilisant *BWA*
- Filtrage des séquences de faible qualité en utilisant *samtools*
- Suppression des duplicats en utilisant *picardtool* (marque les duplicats) puis *samtools* (supprime les séquences marquées par *picardtool*)
- Conversion des fichiers en utilisant *TagAlign*
- Créer des fichiers *Tables* en utilisant le **script de Colin** → donne des informations au sujet de la qualité des séquences et de la corrélation entre les séquences.

**Tissue** : tissu étudié/groupe d'individu

**Rep** : réplicat

**Depth** : profondeur de séquençage

**NRF** : Non Redundant Fraction = % non dupliqué dans la librairie

**PBC1** : PCR Bottlenecking Coefficient 1 = nombre de régions mappées par 1 read uniquement / nombre de régions distinctes mappées par quelques reads uniques

**PBC2** : PCR Bottlenecking Coefficient 2 = nombre de régions mappées par 1 read uniquement / nombre de régions mappées par 2 reads uniquement

**NSC** : Normalized Strand Cross-correlation Coefficient → NSC > 1.1 (higher values indicate more enrichment; 1 = no enrichment)

**RSC** : Relative Strand Cross-correlation coefficient → RSC > 0.8 (< 0 = voir le graphe pour évaluer la qualité ; 0 = no signal; < 1 low quality ChIP; > 1 high enrichment).

Mesure la corrélation entre les reads alignés sur le brin + et le brin -.

strand\_shift : moyenne de taille des fragments.

**Metrics plus prédictif :**

**JSD** : Jensen-Shannon Distance → évalue différence de mapping du ChIP et de l'INPUT sur le génome de référence. Si la valeur est haute, il y a beaucoup de différences entre ChIP et INPUT. Bon si > 0.1

**SJSD** : Synthetic Jensen Shannon Distance → évalue la différence de mapping entre le ChIP et un INPUT parfait simulé ayant la même couverture que le ChIP (généré à partir de la fonction de masse de probabilité de Poisson avec lambda égal à la couverture moyenne dans l'échantillon).

**IJSD** : « INPUT ? » Jensen-Shannon Distance évalue la différence de mapping entre l'INPUT et un ChIP simulé (si bien compris ce type de métrique).

- Peak calling en utilisant *MACStool* et metrics associé  
cut-off q-value < 0.01  
Calcul du fold change le long de l'INPUT  
Fingerprint graph permet d'évaluer le nombre de reads :
  - Courbe exponentielle = bon nombre de read
  - Droite = répartition uniforme des reads (cas de l'INPUT)
  - Inflexion en fin de courbe = indique enrichissementChromHMM : crée des « états » de chromatine en fonction de différents ChIP. Inutile lorsqu'une ou deux marques étudiées.

La visualisation des peaks est possible ensuite avec IGV ou UCSC, de manière classique.

Les fichiers BAM en sortie contiennent les données de peaks.

Afin d'identifier les peaks communs ou différents entre les échantillons, l'outil **bedtools** peut être utilisé facilement (fonction *intersect* entre le fichier GFF et BED)

Pour avoir une liste de gènes associés à des peaks, la fonction **grep** associée à *bedtools intersect* peut être facilement utilisée : grep pour extraire les lignes de « gènes » (avec espace autour pour avoir le bon format de données) puis bedtools intersect entre fichier de peak calling et fichier grep généré précédemment sur les positions des peaks et gènes.

Habituellement 2 réplicats biologiques.

2M reads après alignement et filtration

40-50M de reads bruts

Séquençage en 50 bp single end

### ***Mise en route du pipeline :***

Les documents, explications, fichiers et scripts sont sur <http://github.com/kernco/functional-annotation>

Logiciels/outils à installer préalablement

➔ Système d'exploitation Linux

Mini conda

Python3

Snakemake

Créer un dossier qui sera le dossier de travail du pipeline.

Les données brutes doivent être placées dans ce dossier et le pipeline va le peupler de différents dossiers contenant les analyses, résultats, etc.

Dans le dossier de travail, créer un dossier nommé *Raw\_Reads* dans lequel les fichiers FastQ doivent être placés.

Les fichiers FastQ doivent avoir un nom de la forme *Assay\_Group\_Replicate.fq.gz*

Assay = le type de données (ex : H3K4me3, H4K16ac, RNASeq, etc. ;

Group = identifiant unique partagé par tous les réplicats (ex : tissu, group, condition, etc.) ;

Replicate = identifiant différent pour chaque réplicat d'un même groupe.

Puis créer un fichier config.yaml contenant ces lignes (sans saut de ligne):

**tissues:** [Nom du/des tissus, séparés par une virgule, peut être utilisé pour définir les groupes d'étude]

**reps:** [Identifiant des réplicats, séparés par une virgule]

**narrow\_peaks:** [*H3K4me3, H3K27ac, H3K4me1, CTCF, etc.* marques ayant des peaks assez peu étendus]

**broad\_peaks:** [*H3K27me3*, marques ayant des peaks assez étendus]

**no\_input:** [ATAC, identifiant pour les manips sans INPUT]

**inputs:** [Input, identifiant pour les manips avec INPUT]

**H3K27me3\_input:** *Input*

**H3K4me1\_input:** *Input*

→ Définir la librairie d'INPUT pour chaque marque étudiée. Ne mettre que la/les marque(s) étudiée(s).

**H3K27ac\_input:** *Input*

**CTCF\_input:** *Input*

**genome:** Chemin d'accès au fichier contenant le génome de référence. Exemple :  
/group/zhougrp/Genomes/bosTau8/bosTau8.fa

**genomesize:** Taille du génome de référence en nombre de paires de bases.  
Exemple : 2649748499 Une valeur approximative peut aussi être utilisée.

**annotation:** Chemin d'accès au fichier contenant les données d'annotation du génome de référence. Exemple : /group/zhougrp/Genomes/bosTau8/bosTau8\_Ensembl91.gtf

**mapq:** Défini le cut-off de filtration, la valeur standard est de 30

**tempdir:** chemin du dossier temporaire où stocker les fichiers en cours de traitement.

Puis pour lancer le pipeline, dans le terminal (localisé dans le dossier de travail) taper cette commande :

```
snakemake -j 4 -s /path/to/pipeline/Snakefile --configfile config.yaml -n --use-conda
```

L'argument `-j` permet de définir l'usage du CPU / le nombre de tâches à effectuer en parallèle.

L'argument `-s` permet de définir le chemin d'accès au fichier Snakefile.

L'argument `--configfile` permet de définir le nom du fichier de configuration.

L'argument `-n` permet de faire afficher les tâches qui seront réalisées par le pipeline.

L'argument `--use-conda` permet d'exécuter le pipeline de manière automatique.

### Résultats :

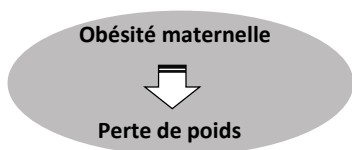
Les dossiers *Figures* et *Tables* contiendront plusieurs résultats du pipeline.

Les fichiers BAM d'alignement des reads seront dans le dossier *Aligned\_Reads* et les fichiers de peak calling dans le dossier *Peak\_Calls*.

Pour l'utilisation de ChromHMM il est nécessaire de modifier le pipeline pour indiquer l'emplacement de ChromHMM sur notre système.

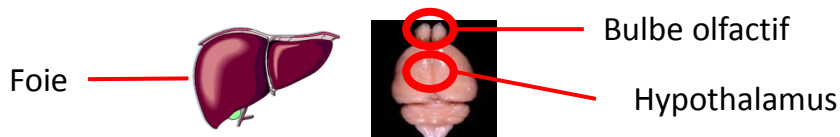
Plot HeatMap a une fonction qui permet de sortir une liste de gènes associés à une marque étudiée.

**Période préconceptionnelle**



**A l'âge adulte**  
**Programmation métabolique?**

6 mâles CD et 6 mâles HFD de chacun des trois groupes maternels



**Analyses en spectrométrie de masse (LC-HRMS)**  
et  
**Annotation des métabolites**



**Analyses statistiques**



		FOIE	BULBE OLFACTIF	HYPOTHALAMUS
Nombre de variables détectées		640	394	398
Nombre de variables annotées		471	394	292
Métabolites		278	258	200
Analyses descriptives (PLS-DA)		Impact global du régime post-sevrage	Impact global du régime post-sevrage	
Analyses différentielles (ANOVA à 2 facteurs, FDR<0,05)	Métabolites impactés par le régime HFD	108	11	16
	Intéraction entre le régime post-sevrage et le groupe maternel	1	0	0
	Métabolites impactés par le groupe maternel	1	0	0



**Analyses bioinformatiques**



**Identification des voies métaboliques impactées par le régime HFD dans chacun des trois tissus**

Figure 51 Résumé graphique de l'étude métabolomique du projet TPMP