



HAL
open science

Impact de différents régimes durant la lactation sur le développement de pathologies cardio-métaboliques chez des souris RCIU

Sarah Saget

► **To cite this version:**

Sarah Saget. Impact de différents régimes durant la lactation sur le développement de pathologies cardio-métaboliques chez des souris RCIU. Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS118 . tel-02949752

HAL Id: tel-02949752

<https://theses.hal.science/tel-02949752>

Submitted on 26 Sep 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.

THESE DE DOCTORAT
Sorbonne Université

Ecole doctorale de Physiologie et Physiopathologie Thérapeutique (ED394)

Présentée par
Sarah SAGET

**IMPACT DE DIFFERENTS REGIMES DURANT LA LACTATION SUR
LE DEVELOPPEMENT DE PATHOLOGIES CARDIO-METABOLIQUES
CHEZ DES SOURIS RCIU**

Soutenue le 24 septembre 2018

Directeur de Thèse: Pr. Yves LE BOUC

Co-Directeur de Thèse: Dr. Laurent KAPPELER

Devant le jury composé de:

Pr. Béatrice DUBERN

Dr. Patricia PARNET

Pr. Didier VIEAU

Dr. Anne GABORY

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury : le Pr Béatrice Dubern pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie mes rapporteurs, le Dr Patricia Parnet et le Pr Didier Vieau pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce manuscrit. Merci également au Dr Anne Gabory pour avoir accepté d'examiner mes travaux de recherche.

Je remercie le Pr Yves Le Bouc de m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour tous vos conseils, pour avoir partagé votre grande culture et vos talents pour cuisiner un cassoulet mais aussi vos nombreuses anecdotes que je vais regretter une fois partie. Merci pour votre présence, toujours avec le sourire et pour avoir toujours ri à mes (supers ?) blagues, je sais qu'elles vont vous manquer !

Je remercie le Dr Laurent Kappeler pour m'avoir encadrée durant ma thèse. Merci d'avoir toujours été là durant ces 4 années, j'ai toujours pu compter sur toi (et tes cocktails). Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir appris tellement de choses et d'avoir réussi à me supporter. Je n'aurais vraiment pas pu espérer meilleur chef, malgré tes interminables « pourquoi ? ». Et mes excuses pour les cheveux blancs que tu as eu à cause de moi (et Lyvianne aussi), c'était pour te laisser un souvenir !

Merci à Clémence. Durant ces deux dernières années, tu as toujours été disponible quand j'avais besoin de toi et tu as toujours été présente aussi bien moralement que scientifiquement. Merci pour ta gentillesse, ta positivité et ton aide précieuse à tout moment. Merci de m'avoir (en)trainée à la Zumba, moment de la semaine indispensable de cette dernière année. On se retrouvera pour travailler dans notre future réserve de quokkas !

Merci à Maud pour son soutien tout au long de ces années. Une fan de Disney comme toi, je n'aurais pas pu rêver mieux comme collègue. Merci pour ta gentillesse, tes histoires et pour cette collection de Tsum Tsum qui trône fièrement chez moi. Merci de m'avoir enseignée l'art de l'histologie (même si je dois avouer que j'ai vraiment raté quelque chose dans le montage des lames...) !

Merci à Patricia pour sa bonne humeur et de m'avoir accueillie dans son bureau ces derniers mois. Merci à Laurence pour son sourire, toutes nos discussions et nos rires. Merci à Marie-Pierre pour sa convivialité, ses potins et sa gentillesse même si tu as décidé de partir trop tôt dans ta Bretagne (nous on n'était pas d'accord du tout) ! Merci à Stéphane pour ta joie de vivre, tes repas (j'ai dû reconnaître que grâce à ta super préparation, le sanglier était très bon) et ton aide à l'organisation de tous les pots du centre.

Merci au Pr Irène Netchine pour ses conseils et pour la vie de château durant un weekend ; à Walid pour tes tentatives de m'expliquer l'empreinte ; à Eloïse, Frédérique, Kanetee et Muriel pour votre gentillesse, nos différentes discussions scientifiques (ou pas), nos repas (plus intéressants) et nos moments piscine (encore plus intéressants). Je remercie tout le reste de l'équipe, je vous souhaite à tous une très bonne continuation. J'ai eu la grande chance de partager ces années dans une super équipe.

Je remercie les membres de l'équipe du Pr Francis Berenbaum qui ont partagé ces 3 dernières années avec nous. Merci à Xavier pour sa bonne humeur, ses nombreuses blagues (enfin j'espère que c'étaient des blagues), sa vidéo de la marche des langoustes pour nous distraire (ou nous endormir). Au plaisir de te revoir à la montagne pour nos R.N... Merci à Claire pour sa gentillesse, ses sourires et toutes les chouquettes que tu nous as rapportées ! Merci à Maria Luisa pour sa bonne humeur, tous les repas et la cohésion entre les deux équipes qu'elle a instaurés, et pensées à Gabriel, le plus beau catalan-castillan que je connaisse! Merci à Natalia pour ses sourires quotidiens et sa gentillesse ; Audrey pour ses sourires et ses potins (si tu as besoin d'apprendre quoique ce soit, n'hésite pas) ; Laure pour sa gentillesse ; Kristell, la méchante #3 qui au fond est un amour ; à Alice, pour ta bonne humeur à toute épreuve. Merci à Indira et Adeline pour avoir égayé nos repas ces derniers mois. Un merci particulier à super Marion, ma super dessinatrice Disney. Merci pour tous nos rires, nos soirées et ta joie de vivre. Désolée de t'avoir lâchement abandonnée dans notre cage de zoo (aussi appelée « bureau ») mais je te souhaite une bonne fin de thèse !

Merci aux supers étudiants ayant pu passer à cet étage : Cindy, la meilleure pâtissière scientifique ! Merci pour ta gentillesse absolue, tes sourires et nos soirées ; Sandy, pour toutes nos discussions qui nous ont permis de nous changer les idées ; Anouchka la bombasse pour toutes tes blagues et tes potins ; Joana pour ta bonne humeur ; Arno(ld) pour ton humour (Ambre, mes excuses de te l'avoir envoyé...); Julie pour ton sourire quotidien et Simge pour ta gentillesse !

Merci à Léa (la méchante) pour tous ces moments passés et les galères de fin de thèse partagées. Merci d'avoir été présente, en particulier ces derniers mois. Tu as toujours su garder ton sourire et ton moral en notre présence et je t'en félicite. Il s'avère que tu n'es peut être pas si méchante au fond, je travaillerai sur la question. Et merci pour tes conseils pour ma reconversion chez Autoroute FM !

Merci à Olivier pour ta profonde gentillesse, tous nos petits-déjeuners/potins, merci de m'avoir toujours écoutée et grâce à toi, je resterai une princesse ! Ne t'ennuie pas trop sans nous ! Merci à Marthe pour ton aide pour le projet et ta gentillesse ; à Véronique, ma super prof, grâce à laquelle j'ai pu partir à New York et pour ton aide au projet et à Bertrand (ou à la moustache) pour m'avoir fait rire même un dimanche.

Merci à tous les membres de l'animalerie : Tatiana, Alizée, Tim et Quentin pour m'avoir acceptée des heures durant avec vous, j'avais l'impression de faire partie de l'équipe. Et un merci particulier à Laetitia pour toutes nos discussions, pour m'avoir formée et ton aide pour les manips !

Merci aussi à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer dans le centre et qui m'ont permis de rendre ses années aussi agréables : Olivier pour ta bonne humeur, Marie-Annick pour ta grande gentillesse, Paul-Patrice pour ton accueil avec le sourire tous les matins, Yuan, Thomas, Romane, Delphine, Tania, Kristin, Pauline....

Merci aux BG du centre. Sans vous, je n'aurais pas pu tenir ces derniers mois, merci d'avoir écouté mes interminables plaintes (je me fatiguais moi-même). Merci pour toutes nos supers sorties et soirées. Anas, le bébé devenue grande et aventurière, merci pour tous ces moments passés ensemble et toutes tes histoires qui m'ont toujours donnée le sourire. Ta force et ta détermination toutes ces années m'ont impressionnées ! Nos lundis salsa nous ont permis de nous échapper et de tenir cette année. Malo, la gentillesse incarnée, tu réussis toujours à voir le bon côté des choses, tu es un vrai modèle à suivre. Merci les filles d'avoir été présentes et d'avoir toujours tenu à me remonter le moral, aussi bien grâce à nos danses endiablées qu'à nos sorties Cité ou Slack !

Merci à ma petite chef, Lyvianne. Je dois le dire, ma plus belle rencontre au labo. En arrivant, je ne pensais pas trouver une aussi bonne amie. Jamais l'une sans l'autre, merci de m'avoir tant fait rire et d'avoir égayé mes journées. Malheureusement, tu as laissé un grand vide à ton départ à l'autre bout du mode même si je sais que je pourrais toujours compter sur toi ! Comme on a l'habitude de se dire, je ne pense pas pouvoir un jour retrouvé cette complicité et ce coup de cœur de travail...

Je remercie ma famille de cœur, sur laquelle j'ai pu compter dans toutes les situations et qui m'a toujours soutenue. Mère, tu es l'un de mes modèles à avoir réussi à toujours tout gérer tout en étant toujours là pour nous et pour un bon restau asiat. Ma sœur, ma demie vahinée, mon double, nous n'avons plus besoin de mots pour se comprendre tellement on est pareille... Que des moments géniaux passés ensemble, et ce n'est pas fini !

Merci à Céline et Aurélie. Vous êtes toujours là après toutes ces années. Merci pour tous nos rires, nos confidences, nos lectures au bord de l'eau et tous ces moments partagés (même au karaoké) sur lesquels nous pourrions écrire des pages et des pages, surtout avec la prose d'Aurélie ! Et toutes nos vacances mémorables, en espérant que ça continue encore longtemps (Argentine 2020 !).

Merci à Amberchou et Cécile, pour tous nos rires et délires et tous ces supers moments passés ensemble ! Amberchou, pour ta présence, toujours un sourire et ta bonne humeur. Cécile, pour ton soutien toutes ces années et nos nombreux brunch et nos supers cinés.

Merci à Anaïs et Bojan pour votre présence, votre sourire, vos blagues (enfin Bojan, faudra s'améliorer mais avec le temps), Anaïs pour ta super cuisine et nos potins (et le super appart). Maybe bientôt les papiers Bobo !!

Merci à Laura, plus de 20 ans d'amitié et toujours là, même à l'autre bout du monde.

Merci à ma post doc australienne préférée, Aude, et Jérémy, j'ai hâte de venir voir si tout va bien à l'autre bout du monde.

Merci à Caroline, ma super encadrante de M1, grâce à toi, j'ai pu apprécier la vie au labo, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur et de m'avoir permis de découvrir une si belle ville !

Merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à la fac et qui m'ont permises de passer de superbes années : Lydie, ma suisse préférée toujours là pour nous réunir après toutes ces années ; Guillaume, le meilleur des voisins et mon acolyte ; Léo, mon super géant avec qui j'ai du partager mon anniversaire ; Thomas, mon roumain préféré ; A'dem (je rectifie d'ailleurs aujourd'hui : c'est toi qui m'a suivi au centre) ; Raphie et sa bonne humeur quotidienne ; Marion même si je ne peux compter que sur tes moqueries en présence de guêpes, Nida, Sami, Fatima, JB, Maher, Pauline et tous les autres...

Et merci à toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer et dont la bonne humeur m'a permis de garder le sourire : Salsera Léa, Sarah la meilleure des profs de salsa, Solia, Barbara, Franck et bien d'autres !

Merci à mon minimoi (petit clone de personnalité un peu trop impressionnant) et mon amie des animaux préférée (qui aime tout de même me faire peur), pour m'avoir acceptée et aimée. Merci à Tia, Safia, JC et des bisous à mes jumeaux préférés...

Pour finir, un grand merci à ma super famille sans qui je ne serais pas ici. Vous m'avez toujours soutenue et crue en moi. Mes parents pour leur présence et leur amour sans faille. Mes grands parents, mes tantes et oncles, mes cousins et ma super marraine, pour votre présence sans faille même lorsque les nouvelles se faisaient plus rares. Merci au meilleur des frères, je n'ai pas vu les années passées et tu resteras mon bébé et le chouchou ! Je vous aime tous.

Sommaire

Liste des Abréviations	4
Liste des Figures	9
Liste des Tableaux	11

INTRODUCTION.....12

I. Les Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD) 13

A. Généralités	13
B. La période fœtale	15
1. Adaptations physiologiques maternelles durant la grossesse	16
a) Adaptations physiques	16
b) Adaptations métaboliques	16
2. Le placenta	17
a) Rôle.....	17
b) Les hormones placentaires.....	19
3. Régulations de la croissance fœtale	20
a) Le système Insulin-like Growth Factor (IGF).....	20
b) L'Insuline.....	23
c) Les Glucocorticoïdes.....	23
d) Autres facteurs régulant le développement fœtal.....	24
4. Altérations de la croissance fœtale	25
a) Généralités	25
b) Diagnostic du RCIU	26
c) Etiologie du RCIU	27
d) Complications associées au RCIU	29
e) Complications métaboliques associées à un RCIU	32
f) Complications selon la période d'atteinte fœtale.....	36
C. Croissance post-natale	39
1. Régulations endocriniennes de la croissance post-natale	40
a) Hormone de croissance hypophysaire (GH-N).....	40

b) Hormones sexuelles	42
2. Régulations nutritionnelles de la croissance post-natale.....	43
3. Rattrapage rapide de la Croissance et impact métabolique	47
4. Les « 1000 jours »	48
D. Impact du dimorphisme sexuel sur l'émergence des pathologies cardio-métaboliques	48
II. Mécanismes Epigénétiques	51
A. Généralités	51
B. La Méthylation de l'ADN	51
C. Les modifications post-traductionnelles des histones	53
D. Les ARN non codants.....	57
1. Nomenclature et outils bio-informatiques.....	58
2. Synthèse des miARNs	59
3. Action des miARNs	61
4. miARNs circulants et bio-marqueurs.....	61
5. miARNs et restriction nutritionnelle maternelle.....	63
III. Objectifs	64
RESULTATS.....	66
Etude de l'impact de différents régimes en période de lactation sur le développement de pathologies cardio-métaboliques chez des souris nées avec un RCIU	67
Contexte :	68
Objectif :	68
Modèle murin :	68
Article :	70
Résultats et Discussion :	71
Etude des profils de miARNs dans le liquide séminal de patients infertiles avec un surpoids ou une obésité associé(e) à un syndrome métabolique	75
Contexte :	76
Objectif :	77
Matériels & Méthodes :	77
Résultats :	79
Conclusion :	80

DISCUSSION	82
ANNEXE.....	93
Etude de l'impact de différents régimes en période de lactation sur le développement de l'axe gonadotrope chez des souris femelles nées avec un RCIU	94
Contexte :	95
Objectif :	96
Matériels & Méthodes :	96
Résultats :	99
Conclusion :	102
BIBLIOGRAPHIE	105

Liste des Abréviations

11 β -HSD2 : 11 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase 2

ACC : *Acetyl-CoA carboxylase*

AgRP : *Agouti-related Protein*

ALS : Sous unité d'acide labile, *Acid Labile Subunit*

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ANP : Facteur natriurétique auriculaire ou Peptide atrial natriurétique, *atrial natriuretic peptide*

ARC : Noyau arqué

ARNnc : ARN non codants

AVPV : Noyau périventriculaire antéro-ventral

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

CART : *Cocaine and Amphetamine Related Transcript*

CDKN1C : *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C*

CEBP β : *CCAAT enhancer binding protein β*

ChIP-Seq : *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*

CTCF : *CCCTC-Binding Factor*

Cyp7 α 1 : Cholestérol 7- α hydroxylase

DGCR8 : *DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*

DMN : Noyau Dorsomédian

DMR : *Differentially Methylated Region*

DNMT : ADN Méthyltransférase

DOHaD : Origines Développementales de la Santé et des Maladies, *Developmental origins of health and disease*

FAS : *Fatty Acid Synthase*

FOAD : *Fœtal Origins of Adult Disease*

FSH : Hormone folliculo-stimulante, *Follicle Stimulating Hormone*

G6P : Glucose-6-Phosphate

G6Pc : Glucose-6-Phosphatase

GDF3 : *Growth differentiation factor-3*

GH : Hormone de Croissance, *Growth Hormone*

GHBP : *Growth Hormone Binding Protein*

GH-N : Hormone de Croissance hypophysaire

GHR : *Growth Hormone Receptor*

GHRH : *Growth Hormone Releasing Hormone*, somatolibérine

GHSs : *Growth Hormone Secretagogues*

GK : Glucokinase

GLUT : Transporteur de glucose, *glucose transporter*

GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone*, gonadolibérine

ip-GTT : Test de tolérance au glucose par voie intra-péritonéale, *intra-peritoneal Glucose Tolerance Test*

H3 : Histone 3

H3K4me3 : Tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone 3

HATs : Histones Acétyltransférases

HDAC : Histone Désacétylase

hGH-V : Hormone de Croissance placentaire, *human Growth Hormone variant (placental GH)*

hCG : Hormone Chorionique Gonatotrope humaine, *human Chorionic Gonadotropin*

HMTs : Histones Méthyltransférases

hPL : Hormone Lactogène Placentaire, *human Placental Lactogen*

ICRs : *Imprinting Control Regions*

IGF : *Insulin-like Growth Factor*

IGF1R : *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*

IGFBP : *Insulin-like Growth Factor Binding Protein*

IgG : Immunoglobulines G

IMC : Indice de Masse Corporelle

IR : Récepteur à l'insuline

ITT : Test de sensibilité à l'insuline, *Insulin Tolerance Test*

K : Lysine

KCNQ1 : *Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1*

LBW : *Low Birth Weight*

LGA : *Large for Gestational Age*

LH : Hormone lutéinisante, *Luteinizing Hormone*

LHA : Aire latérale hypothalamique

LXR : *Liver X receptor*

α MSH : *α -Melanocyte-stimulating hormone*

MC-R : *melanocortin receptor*

miARN : MicroARN

miR : MicroARN mature

NPY : Neuropeptide Y

PACT : *Protein Activator of the interferon-induced protein kinase*

PAG : Petit Poids pour l'âge gestationnel

PAR : Réponse Adaptative Predictive, *Predictive Adaptive Response*

PDX-1 : *Pancreatic and duodenal homeobox-1*

PEPCK : *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*

PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PKCζ : Protéine Kinase C zêta

POMC : Pro-opiomélanocortine

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PVN : Noyau Paraventriculaire

R : Arginine

RCIU : Retard de Croissance Intra Utérin

RISC : *RNA-induced silencing complex*

RT-PCR : *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

SA : Semaine d'Aménorrhée

SMet : Syndrome Métabolique

SGA : *Small for Gestational Age*

SREBP-1c/ADD1 : *Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c/Adipocyte Determination Differentiation-dependant factor 1*

SRIH : *Somatotropin Release Inhibiting Hormone, somatostatine*

STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*

TA : *Tissu Adipeux*

TFIID : *Transcription factor II D*

TRBP : *Transactivating Response RNA-Binding Protein*

UCP-1 : *Thermogénine, uncoupling protein 1*

UTR : *Untranslated Region*

WT : *Wild Type*

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique de la théorie des origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte (DOHaD)	14
Figure 2 : Différents niveaux de régulation ayant une influence sur la croissance fœtale	20
Figure 3 : Effet de différentes invalidations génétiques du système IGF sur la croissance fœtale chez la souris.....	21
Figure 4 : Courbes de croissance fœtale et néonatale chez l'humain	25
Figure 5 : Différentes origines du RCIU	27
Figure 6 : Hypothèse du développement de l'hypertension à cause d'une sous-nutrition maternelle	31
Figure 7 : Vitesse de Croissance du cerveau selon les espèces	38
Figure 8 : Différentes conséquences à long terme de la descendance de la cohorte néerlandaise	39
Figure 9 : Représentation schématique de l'axe somatotrope.....	40
Figure 10 : Représentation schématique de l'axe gonadotrope.....	42
Figure 11 : Schéma de la réaction de méthylation de l'ADN sur le carbone 5 d'un résidu cytosine	52
Figure 12 : Représentation de la configuration histone-ADN du nucléosome	53
Figure 13 : Représentation des principales modifications post-traductionnelles des histones	53
Figure 14 : Schéma de la biogenèse des microARNs.....	59
Figure 15 : Modèle murin d'induction de RCIU et de modulation de la nutrition durant la lactation.....	69
Figure 16 : Taille à 3 mois chez les souris RCIU femelles en fonction de la nutrition périnatale	71
Figure 17 : ipGTT et ITT à l'âge de 3 mois et 12 mois chez les souris femelles.....	71
Figure 18 : Taille et concentration en IGF-1 à 3 mois chez les souris RCIU mâles en fonction de la nutrition périnatale	72

Figure 19 : Phosphorylation d'AKT dans le muscle des souris RCIU en fonction de la nutrition périnatale à l'âge de 3 mois	73
Figure 20 : Voie PI3K-PTEN-AKT	73
Figure 21 : Expression du miR-19b-3p dans le foie et le plasma des souris RCIU en fonction de la nutrition périnatale	74
Figure 22 : Impact du syndrome métabolique sur l'expression de différents microARNs dans le plasma séminal.....	79
Figure 23 : Impact du syndrome métabolique sur l'expression des miR-19a et miR-19b dans le plasma séminal.....	80
Figure 24 : Expression du miR-19b dans le plasma séminal d'homme ayant eu une AMP	80
Figure 25 : Poids à 18 mois des souris RCIU femelles en fonction de la nutrition périnatale..	87
Figure 26 : Représentation schématique du moment de la différenciation ovarienne chez la femme et la souris.....	95
Figure 27 : Courbes de croissances post-natales, taille et index de Lee à 3 mois chez des souris RCIU en fonction de la nutrition périnatale.....	99
Figure 28 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur l'âge de l'ouverture vaginale chez la souris RCIU	100
Figure 29 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur l'âge du premier œstrus chez la souris RCIU	100
Figure 30 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur le poids corporel et celui de l'utérus chez la souris RCIU à 28 jours.....	101
Figure 31 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur l'expression de gènes de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez la souris RCIU à 28 jours.....	101
Figure 32 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur la durée du cycle œstral chez la souris RCIU adulte.....	102
Figure 33 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur le poids corporel et l'utérus chez la souris RCIU adulte en période de pro-oestrus	102
Figure 34 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur les capacités de reproduction chez la souris RCIU adulte	103

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Critères d'appartenance au syndrome métabolique selon les différentes organisations	30
Tableau 2 : Conséquences à long terme d'une restriction nutritionnelle durant la période foetale et/ou post-natale précoce sur le phénotype de la descendance.....	37
Tableau 3 : Modifications épigénétiques au niveau de gènes associés à des pathologies métaboliques dans la descendance de mère soumise à une restriction alimentaire	54
Tableau 4 : Caractérisation de miARNs présents dans 12 fluides biologiques	61
Tableau 5 : Compositions nutritives des aliments utilisés pour le protocole d'induction du RCIU	69
Tableau 6 : Sondes pour les PCR en temps réel de microARN des extraits de plasmas séminaux	78
Tableau 7 : Listes des amorces pour les PCR en temps réel sur ADN complémentaire	98

INTRODUCTION

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

A. Généralités

La notion d'une origine développementale de la Santé et de certaines Maladies apparaissant classiquement à l'âge adulte s'est développée durant ces dernières décennies. En effet, des études épidémiologiques dans les années 1980 ont mis en évidence une relation inverse entre le poids de naissance et le développement de pathologies cardio-métaboliques à l'âge adulte, telles qu'une hypertension artérielle, un diabète de type 2 et une obésité. Ceci a permis d'émettre, dans un premier temps, l'hypothèse d'une origine foetale des pathologies à l'âge adulte (FOAD, *Fœtal Origins of Adult Disease*)(Calkins and Devaskar 2011).

David Barker a notamment montré dans une étude publiée en 1989, une corrélation inverse entre poids de naissance et la pression artérielle systolique à l'âge de 10 ans et de manière plus notable à l'âge de 36 ans. Grâce à cette étude, Barker a émis l'hypothèse que certaines pathologies à l'âge adulte comme l'hypertension artérielle seraient en lien avec un environnement intra-utérin ou en période post-natale altéré (Barker *et al.* 1989). Il a ensuite confirmé son hypothèse en 1990 par une autre étude sur une cohorte plus petite, et montré que les hommes et femmes ayant des pressions artérielles élevées avaient un plus petit poids de naissance, associé à un plus gros placenta (Barker *et al.* 1990). De plus, il a également publié en 1989 une étude où il a montré que les hommes ayant les plus petits poids à la naissance et à un an présentaient un taux de mortalité par cardiopathie ischémique plus élevé (Barker *et al.* 1989). Par la suite, ce concept a pu être étendu au diabète de type 2 avec une étude, toujours sur les cohortes britanniques, montrant qu'un petit poids de naissance chez l'homme était associé à un risque accru de développer une intolérance au glucose et un diabète de type 2 (Hales *et al.* 1991). Suite à ces différentes études, Hales et Barker ont proposé en 1992 l'hypothèse d'un phénotype économe, *the thrifty phenotype hypothesis*. Cette hypothèse sous-tend que les pathologies cardio-

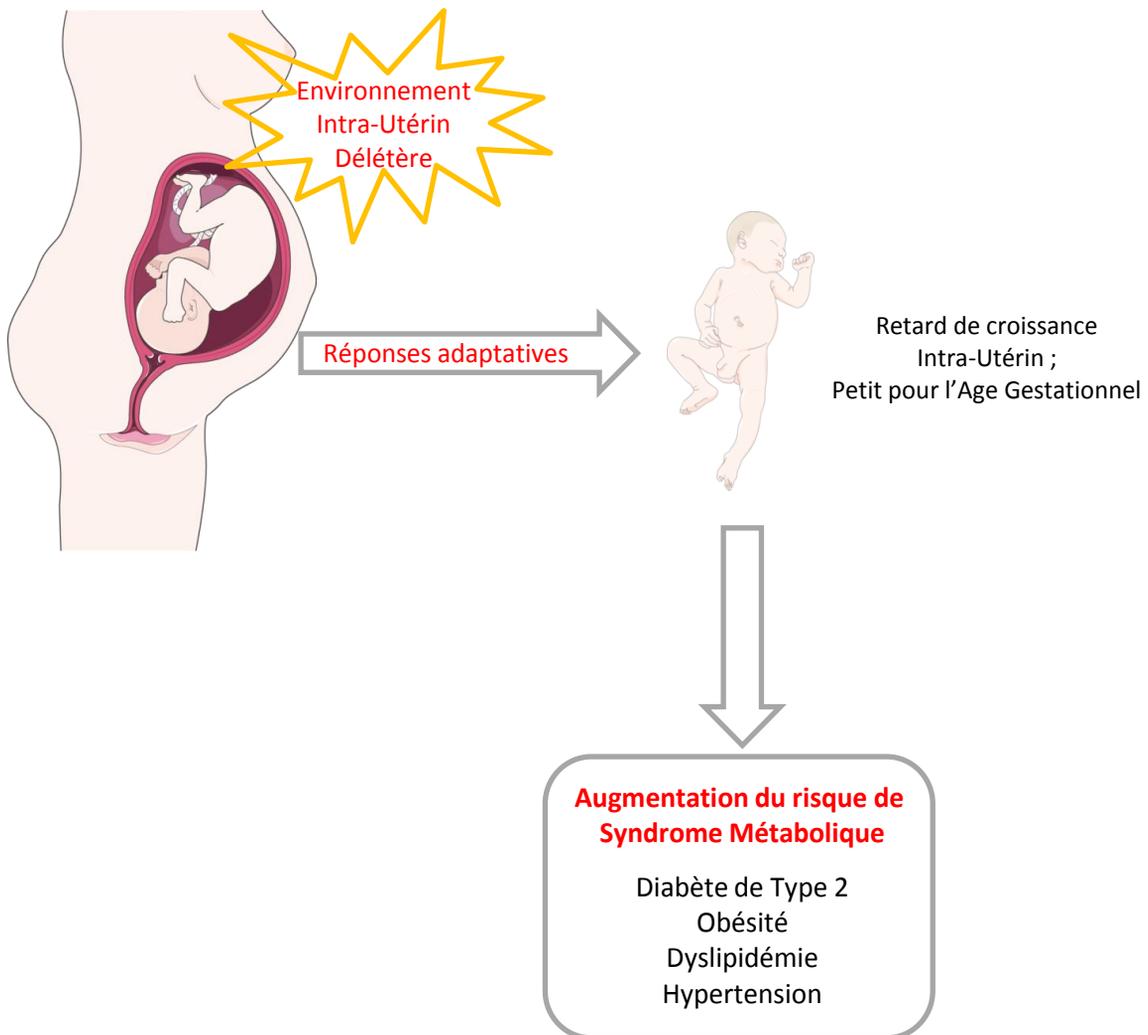


Figure 1 : Représentation schématique de la théorie des origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte (DOHaD). Des réponses adaptatives seraient mises en place afin de pallier un environnement intra-utérin délétère. Ces adaptations pourraient contribuer à l'augmentation du risque de pathologies cardio-métaboliques en cas d'environnement post-natal surabondant par rapport à l'environnement intra-utérin (Image: Servier Medical Art).

métaboliques pourraient être programmées durant la période fœtale et résulter d'un environnement intra-utérin délétère. Ainsi en cas d'environnement défavorable *in utero* pendant une période critique du développement du fœtus, ce dernier pourrait développer un phénotype économe favorisant la survie aux dépens de certains organes (comme le pancréas ou les reins) qui pourraient ainsi avoir un développement limité, en affectant par exemple de façon permanente leur taille et/ou leur structure (Charles *et al.* 2016). Par exemple, une malnutrition de la mère pendant la grossesse peut conduire à un retard de croissance intra-utérin (RCIU) du fœtus pour lequel la croissance du cerveau serait privilégiée afin que celui-ci soit protégé au détriment d'autres organes. Ainsi, au cours de la vie fœtale, le développement du pancréas serait vulnérable à une malnutrition fœtale et une altération de cette dernière entraînerait une dysfonction des cellules β des îlots de Langerhans à l'âge adulte. En outre ces altérations seraient associées à des modifications du métabolisme, également plus prône à favoriser le stockage.

En résumé, Hales et Barker ont proposé l'hypothèse qu'une malnutrition du fœtus et du nourrisson entraînerait des changements permanents de la structure et/ou de la fonction de certains organes et tissus, et que le moment et la nature précis de ces altérations détermineraient la susceptibilité au développement de pathologies à l'âge adulte telles qu'une hypertension, une intolérance au glucose, un diabète et une hyperlipidémie (Hales and Barker 1992).

Cette hypothèse a ensuite été affinée par une hypothèse de réponse adaptative prédictive, *the predictive adaptive response hypothesis* (PAR). Cette hypothèse sous-entend que, en cas d'apports nutritionnels ou d'oxygène non-optimaux, le fœtus y répondrait en diminuant sa vitesse de développement afin d'assurer sa survie. Cette adaptation serait associée à une taille plus petite, plus propice à la survie dans un environnement appauvri mais aussi à des adaptations fonctionnelles et métaboliques en accord avec un environnement anticipé comme appauvri. Le fœtus se préparerait ainsi à l'environnement qu'il prévoit d'affronter à la naissance. Cependant, en cas de déviation entre la situation prédite *in utero* et la situation réelle, la fréquence des pathologies cardio-métaboliques serait accrue (**Figure 1**) (Bateson *et al.* 2004; Gluckman *et al.* 2005). D'autres études épidémiologiques sont venues appuyer ces observations, notamment celles sur la cohorte d'enfants nés à la fin de la seconde guerre mondiale aux Pays Bas et dont les mères avaient

été exposées à la famine durant leur grossesse. Par exemple, Ravelli et ses collègues ont pu observer que l'exposition à la famine, en particulier à la fin de la grossesse, entraînait une intolérance au glucose chez la descendance à l'âge adulte (Ravelli *et al.* 1998).

Ainsi, la PAR serait une forme de plasticité phénotypique en vue d'adapter l'organisme à un environnement anticipé en période *in utero* et post-natale. Je vais présenter par la suite certains des facteurs de régulation et d'adaptation durant ces deux périodes.

B. La période fœtale

Le développement *in utero* durant la grossesse (ou gestation) se divise en 2 phases : la phase embryonnaire et la phase fœtale. La phase embryonnaire dure de la fécondation, résultant de la fusion d'un ovocyte et d'un spermatozoïde, à la fin de l'organogénèse (8^{ème} semaine de développement). Durant cette phase, l'embryon se développe en passant par les stades zygote, morula et blastocyste puis l'organogénèse se produit et l'embryon deviendra fœtus (O'Rahilly 1987; O'Rahilly and Muller 2010). La phase fœtale est marquée par une croissance rapide en taille et en poids du fœtus. Les organes développés au cours de la phase embryonnaire subissent une maturation et se spécialisent. Dès le début de la grossesse, l'organisme maternel doit se préparer au développement du fœtus et des adaptations ont lieu afin de lui assurer un développement et une croissance optimale. La croissance est sous l'influence de différents facteurs biologiques. Ainsi, un apport nutritionnel adéquat est indispensable pour soutenir une qualité et une vitesse de croissance adaptées. La période où la vitesse de croissance est la plus importante se situe en période périnatale, qui inclut le développement en périodes fœtale et post-natale précoce.

1. Adaptations physiologiques maternelles durant la grossesse

a) Adaptations physiques

La modification la plus marquée durant la gestation est l'augmentation du poids de la mère. Cette prise de poids est due au fœtus mais aussi aux annexes fœtales comme le placenta et le liquide amniotique, ainsi qu'à l'accroissement tissulaires de certains organes maternels (seins, tissu adipeux...) permettant de couvrir les besoins du fœtus. La grossesse s'accompagne de modifications au niveau d'autres organes. En effet, il est observé une augmentation du débit cardiaque accompagnée d'une diminution de la pression artérielle moyenne qui est due à la diminution de la résistance vasculaire systémique (Atkins *et al.* 1981; Chapman *et al.* 1998). De même, il y a une augmentation des besoins en oxygène pour le fœtus et le placenta et donc notamment une augmentation de la fréquence respiratoire.

b) Adaptations métaboliques

Lors de la gestation, la mère doit assurer les apports nécessaires au développement du fœtus. Elle doit ainsi se créer des réserves d'énergie et de substrats suffisantes pour faire face aux exigences de la grossesse mais aussi à celles de la lactation à venir. Chez la femme, durant les deux premiers trimestres de la grossesse a lieu la phase anabolique : le coût calorique de la croissance fœtale reste faible et il y a donc une mise en réserve de composés riches en énergie comme les lipides dans certains organes tels que les seins ou le tissu adipeux. Ces réserves seront alors utilisées en partie durant le dernier trimestre (phase catabolique) par le fœtus pour répondre aux besoins nécessaires à sa croissance (Kominiarek and Peaceman 2017). La grossesse est accompagnée d'une hyperlipidémie, surtout pour les triglycérides, et de changements dans la morphologie des adipocytes qui vont augmenter leur capacité de stockage (Hadden and McLaughlin 2009). Le métabolisme glucidique est aussi fortement impacté car le glucose est le principal substrat oxydatif pour le fœtus (Herrera and Ortega-Senovilla 2010).

Durant la grossesse et de manière physiologique, une résistance à l'insuline s'installe progressivement chez la mère au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle. Elle

commence vers la mi-grossesse et progresse durant le troisième trimestre. Cette résistance semble résulter de la combinaison de l'augmentation de l'adiposité maternelle, de l'augmentation des acides gras libres plasmatiques et des effets insulino-désensibilisants des hormones placentaires. Cette résistance permet notamment d'augmenter la production hépatique de glucose, nécessaire aux besoins du fœtus (Homko *et al.* 1999). Cette résistance à l'insuline est transitoire et diminue rapidement après l'accouchement. D'autre part, il a été montré que les cellules β pancréatiques augmentaient leur sécrétion d'insuline afin de compenser la résistance à l'insuline. Ainsi, les changements dans le taux de glucose circulant sont faibles par rapport aux changements plus importants dans la sensibilité des tissus à l'insuline. C'est donc la grande plasticité de la fonction des cellules β qui permet une adaptation et une régulation normale du glucose pendant la grossesse. Une déficience de la fonction pancréatique peut entraîner une insulino-sécrétion insuffisante et conduire à un diabète gestationnel (Buchanan and Xiang 2005; Lain and Catalano 2007). Ce dernier peut avoir un impact aussi bien sur le développement du fœtus (croissance fœtale excessive, hypoglycémie néonatale) que sur la mère (pré-éclampsie, risque de développer par la suite un diabète de type 2) (Buchanan *et al.* 2012). Une étude prospective menée sur plus de 3000 naissances en 2012 a notamment évalué la prévalence de diabète gestationnel à 8% en France métropolitaine (Regnault *et al.* 2016).

2. Le placenta

a) Rôle

Le placenta est un organe transitoire qui se forme pendant la gestation chez les vivipares. Il se forme après l'implantation du blastocyste sur l'endomètre du tissu utérin. Chez les mammifères, il existe différentes formes de placenta mais son rôle reste le même : permettre et filtrer les échanges materno-fœtaux nécessaires au développement de l'embryon. Le lieu de ces échanges est appelé barrière fœto-placentaire. Chez les primates, comme chez les rongeurs, il est de type hémochorial : les villosités du trophoblaste baignent directement dans le sang maternel (Malassine *et al.* 2003; Tarrade *et al.* 2014). Le placenta permet les échanges par diffusion passive ou grâce à des transporteurs, le sang fœtal arrive

au placenta par 2 artères ombilicales et après les échanges, il repart purifié et chargé en nutriments et oxygène par une veine ombilicale. Il a notamment un rôle dans la fonction respiratoire en permettant les échanges avec le sang riche en oxygène maternel, et dans la fonction nutritive car le fœtus puise ses nutriments dans le sang maternel. Par exemple, le glucose est transporté par les transporteurs de glucose (GLUT) et notamment par GLUT1 (Desforges and Sibley 2010; Lager and Powell 2012). De même, les acides aminés sont transportés de manière active au travers du placenta, et présentent ainsi une concentration plus élevée dans le plasma fœtal. Les triglycérides des lipoprotéines sont hydrolysés par des lipoprotéines lipases, localisées dans le placenta, libérant ainsi des acides gras. De plus, le placenta possède aussi un rôle dans l'immunisation du fœtus. En effet, les anticorps maternels protègent le fœtus *via* les Immunoglobulines G (Ig G), les seules capables de passer la barrière hémato-placentaire (Englund *et al.* 1998). Le placenta sécrète également des hormones stéroïdiennes et peptidiques qui participent à la régulation de la croissance fœtale et qui peuvent aussi influencer sur la mère. A l'inverse, le placenta protège également le fœtus de certains facteurs présents dans le sang maternel. En ce sens, les glucocorticoïdes, stéroïdes capables de traverser facilement le placenta et ayant des effets importants sur la croissance fœtale et la maturation de certains organes, doivent être bloqués. Ceci est réalisé au niveau du placenta qui est enrichi en 11 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase 2 (11 β -HSD2), une enzyme permettant la conversion de cortisol en cortisone et d'inactiver les glucocorticoïdes (le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez les rongeurs). Cependant, certains corticostéroïdes de synthèse comme la dexaméthasone ne sont pas inactivés par la 11 β -HSD2 et passent la barrière placentaire, pouvant ainsi limiter la croissance fœtale (Jones *et al.* 2007).

En cas d'environnement maternel défavorable, la morphologie placentaire, le flux sanguin, la fonction endocrine du placenta ou encore les échanges materno-fœtaux peuvent être affectés. Le placenta est capable de s'adapter à son environnement afin d'optimiser ses fonctions pour favoriser la survie du fœtus. En effet, une étude chez la brebis a montré qu'une dénutrition en milieu de gestation entraînait une augmentation de la taille du placenta et limitait ainsi l'altération de la croissance fœtale. La croissance compensatoire du placenta pourrait survenir comme une réponse précoce à l'apport réduit en nutriments afin de pallier le développement d'un potentiel retard de croissance intra-utérin (RCIU) (McCrabb

et al. 1991). Cependant, en cas d'insuffisance placentaire, la croissance fœtale pourrait être altérée, entraînant un risque accru de développer un syndrome métabolique à l'âge adulte (Tarrade *et al.* 2015).

b) Les hormones placentaires

En plus de son rôle protecteur et de transport, le placenta produit un certain nombre d'hormones qui sont importantes pour le bon déroulement de la gestation et qui favorisent la croissance du fœtus. Parmi celles-ci, on peut citer l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), qui est produite dès le stade blastocyste et dont les niveaux augmentent fortement suite à l'implantation de l'embryon. Les niveaux d'hCG peuvent être mesurés dès 10 jours après la fécondation et le pic de production se trouve entre la 10^e et la 11^e semaine de grossesse. L'hCG intervient dans le maintien du corps jaune et permet d'assurer une production continue de progestérone et d'œstradiol (Makrigiannakis *et al.* 2017).

Chez la femme, le corps jaune se dégrade vers la fin du premier trimestre et le placenta prend le relais pour la production de progestérone à partir du cholestérol maternel circulant et de précurseurs fœtaux. La progestérone favorise la nidation de l'embryon et permet ensuite le maintien de la grossesse en inhibant les contractions utérines et en prévenant le rejet du fœtus. Elle permet aussi de stimuler l'apport alimentaire maternel. Comme pour la production de progestérone, le placenta augmente également la production des œstrogènes de manière exponentielle après la 6^{ème} semaine de grossesse. Les effets de ces hormones se combinent à ceux de la progestérone pour préparer les glandes mammaires à la lactation en stimulant la production et sécrétion de prolactine (Newbern and Freemark 2011).

L'hormone lactogène placentaire humaine (hPL ou hormone chorionique somatotrophique) est détectable dans le sang dès la 3^{ème} semaine de gestation et sa sécrétion suit l'évolution de la masse placentaire. Son rôle est mal élucidé mais elle préparerait la lactation en induisant la prolifération et la différenciation des cellules des glandes mammaires et favoriserait la croissance fœtale (Tarrade *et al.* 2014). En effet,

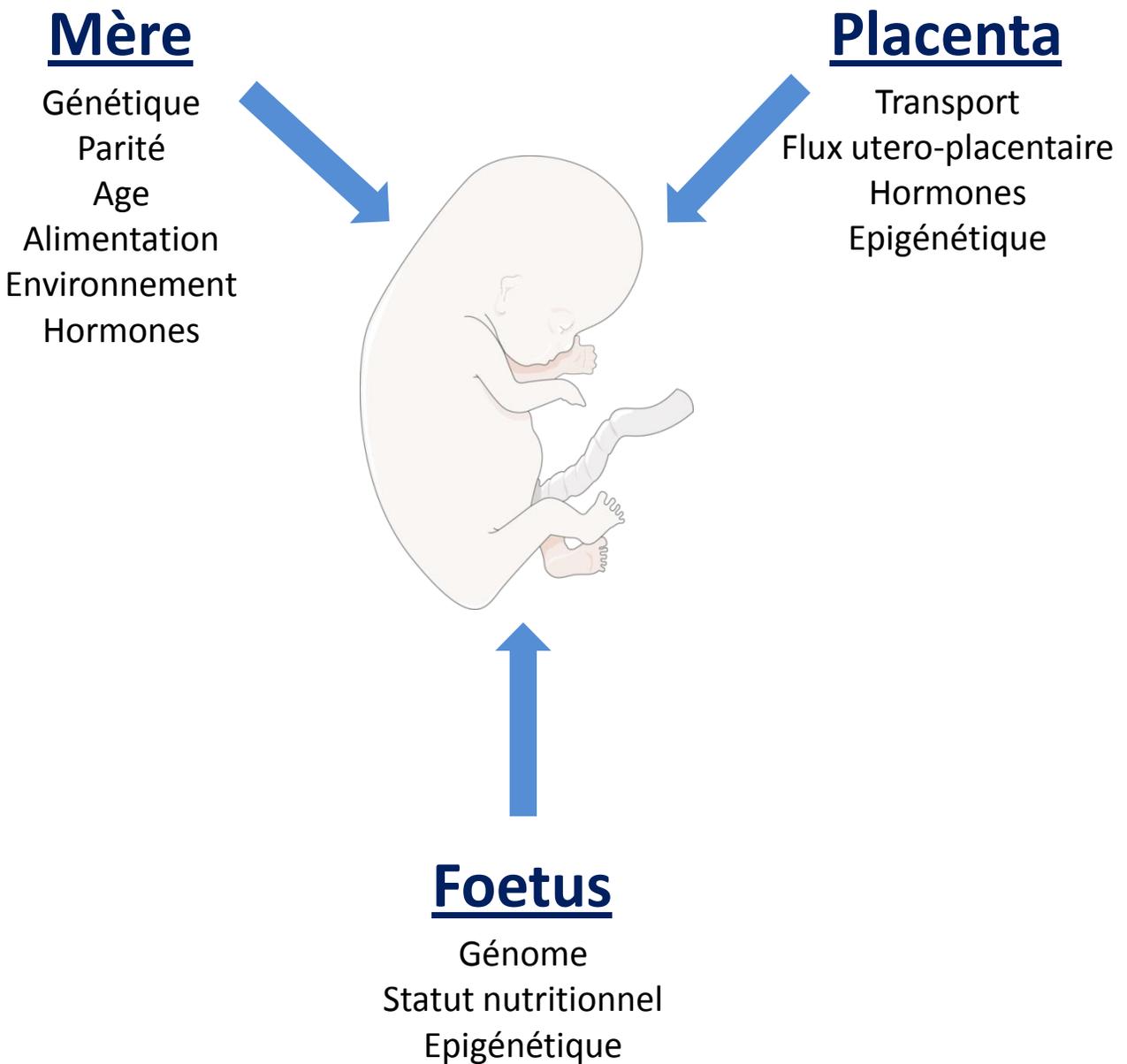


Figure 2 : Différents niveaux de régulation ayant une influence sur la croissance fœtale. La croissance fœtale peut être régulée par différents facteurs pouvant être d'origine maternelle, placentaire ou fœtale (*Image: Servier Medical Art*).

l'hPL favoriserait l'apport de nutriments au fœtus, notamment en ayant des effets anaboliques sur le métabolisme maternel ce qui favorise la croissance fœtale.

L'hormone de croissance placentaire (GH-V) diffère de l'hormone de croissance hypophysaire (GH-N) par 13 acides aminés et par sa sécrétion continue. En début de grossesse, la GH circulante est d'origine hypophysaire mais est progressivement remplacée par la GH-V à partir du second trimestre qui reste uniquement dans la circulation maternelle. Celle-ci stimulerait la production d'IGF1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) maternel ce qui permettrait l'anabolisme et potentiellement l'augmentation de taille des différents tissus comme les seins ou l'utérus (Handwerger and Freemark 2000). La sécrétion de GH-V est régulée en partie par la taille du placenta, mais aussi par le taux de glucose maternel : une hypoglycémie augmenterait sa production alors que l'administration de glucose l'inhiberait. La GH-V agirait comme un inhibiteur de l'insuline et formerait une boucle de rétro-action, assurant ainsi une distribution constante de nutriments pour le développement du fœtus (Newbern and Freemark 2011). De plus, l'hPL et la GH-V prépareraient probablement, et de manière concomitante avec la prolactine hypophysaire, la lactation en induisant la prolifération et la différenciation des cellules de la glande mammaire.

3. Régulations de la croissance fœtale

La régulation de la croissance fœtale est un processus complexe dépendant de nombreux facteurs comme la génétique du fœtus, la vascularisation placentaire, la disponibilité en nutriments et oxygène pour le fœtus, la nutrition maternelle et de différentes hormones d'origine maternelle, fœtale et placentaire (**Figure 2**) (Gluckman 1995). Parmi les nombreux facteurs et hormones impliqués dans le développement du fœtus, on peut citer notamment les IGFs et l'insuline qui promeuvent la croissance fœtale, et à l'inverse les glucocorticoïdes qui l'inhibent.

a) *Le système Insulin-like Growth Factor (IGF)*

Le système IGF est impliqué dans la croissance et le développement fœtal. Il comprend deux ligands (IGF1 et IGF2), deux récepteurs (IGF1R et IGF2R), six protéines de

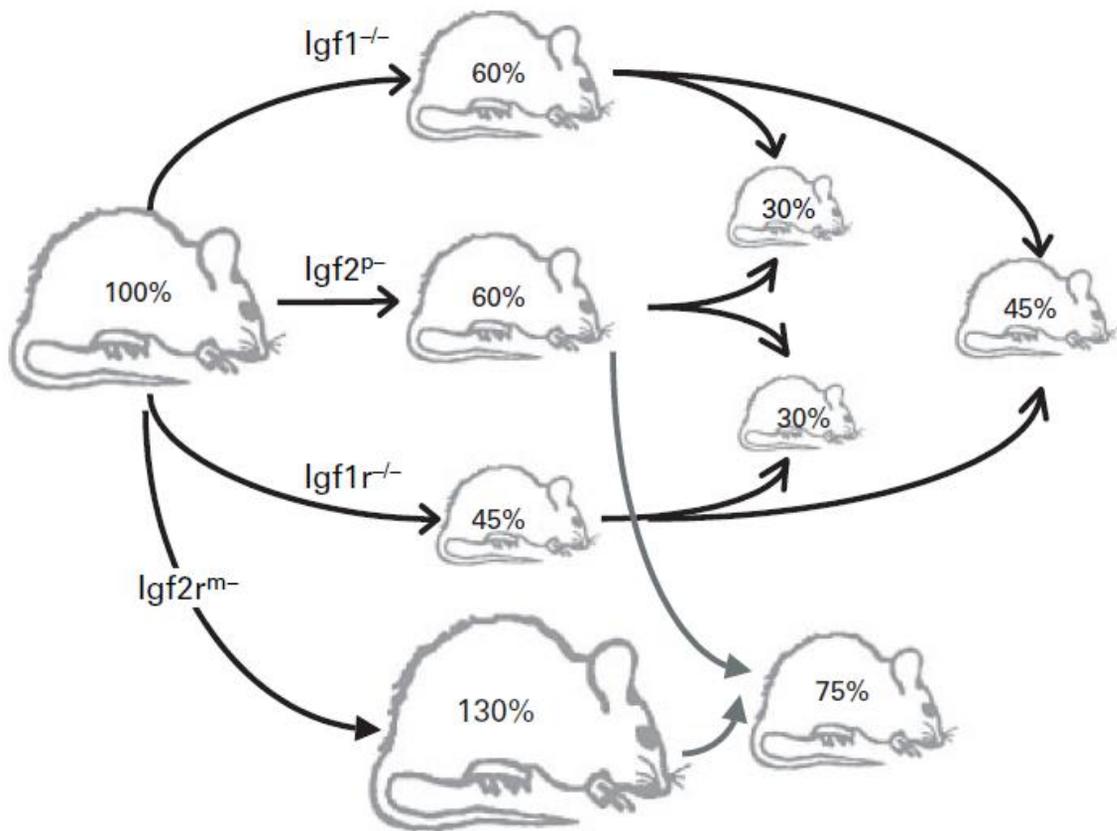


Figure 3 : Effet de différentes invalidations génétiques du système IGF sur la croissance fœtale chez la souris. Expression en pourcentage de la croissance pondérale par rapport au poids normal pour les différents mutants d'*Igf1*, *Igf2*, *Igf1R* seuls ou combinés. m- : inactivation allèle maternel, p- : inactivation allèle paternel, -/- : inactivation des deux allèles. D'après Gicquel, C *et al*, 2006.

liaison (IGFBP-1 à 6). L'IGF1 et l'IGF2 agissent tous deux *via* l'IGF1R. L'IGF2R quant à lui lie l'IGF2, l'internalise et permet ainsi sa clairance.

Concernant les ligands, l'*IGF2* est exprimé dans les tissus fœtaux dès le stade préimplantatoire puis *IGF2* et *IGF1* sont tous deux exprimés jusqu'à la phase finale de maturation des tissus avant la naissance. Ils ont une action autocrine et paracrine et sont également présents dans le sang fœtal. Un des rôles le plus connu des IGFs est leur action stimulatrice sur la prolifération et la différenciation cellulaire (Gicquel and Le Bouc 2006).

IGF2 est le principal facteur de croissance qui favorise le développement embryonnaire. IGF2 est un gène soumis à empreinte parentale et est majoritairement exprimé par l'allèle paternel. Une altération de l'empreinte parentale est associée à des pathologies telles que le syndrome de Beckwith-Widemann, caractérisé par une croissance excessive *in utero*, ou le syndrome de Silver-Russel, caractérisé par un RCIU (Gicquel and Le Bouc 2006). Pendant la période fœtale, ses taux sont 3 à 10 fois plus élevés que ceux d'IGF1 (Fowden 2003). A l'âge adulte chez les rongeurs, IGF2 présente des taux extrêmement faibles dans la circulation sanguine et il reste surtout exprimé dans le cerveau. Ainsi, il y a un shift dans la prédominance des IGFs avant et après la naissance (Jones and Clemmons 1995), où seul l'IGF1 circulant contrôle la croissance durant la période post-natale. IGF1 est produit par un gène totalement indépendant d'*IGF2*, et n'est pas soumis à l'empreinte parentale. Sa concentration plasmatique *in utero* est basse par rapport aux valeurs en période post-natale et ses taux augmentent rapidement après la naissance notamment grâce à sa production par le foie après stimulation par la GH-N (à partir de 20 jours de vie chez la souris). Il a été très tôt associé à une stimulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire. Il possède également un rôle hypoglycémiant et stimule l'anabolisme protéique.

Afin d'étudier les rôles du système IGF au cours du développement fœtal et post-natal, différents modèles d'inactivation ou de surexpression génétique des gènes *Igf1*, *Igf2* ou d'*Igf1r*, ont été créés (**Figure 3**) (Liu *et al.* 1993). Ainsi, des souris transgéniques surexprimant l'IGF1 humain (hIGF1) présentent un gain de poids à partir de 6 semaines de vie avec une tête agrandie (Mathews *et al.* 1988). A l'inverse, l'inactivation complète d'*Igf1* (*Igf1*^{-/-}) induit une diminution de 40% du poids à la naissance et entraîne une mortalité de 95% des souriceaux à la naissance. Les souriceaux survivants présentent une atrophie

musculaire et un défaut de développement pulmonaire. De plus, il a été montré que l'hétérozygotie entraînait une diminution de 37% des niveaux d'IGF1 circulants ainsi qu'une réduction du poids à la naissance mais à des âges plus avancées (à 4-6 mois, les mâles hétérozygotes présentaient un poids réduits de 17% par rapport aux contrôles) (Powell-Braxton *et al.* 1993). L'inactivation d'*Igf2* (*Igf2*^{-/-}) conduit aussi à une diminution du poids de 40% mais n'affecte pas la vitesse de croissance en période post-natale (DeChiara *et al.* 1990). Le retard de croissance le plus sévère apparaît en cas d'inactivation de l'*Igf1r* ou des *Igf1* et *Igf2* combinés montrant l'importance de ce récepteur (Holzenberger *et al.* 2000; Gicquel and Le Bouc 2006). Ces données confirment le rôle d'IGF2 dans le développement fœtal principalement, *via* l'IGF1R. Concernant l'IGF1, celui-ci a un rôle important dans la croissance post-natale et fœtale également, malgré des niveaux plus faibles que l'IGF2. Ce rôle est particulièrement important puisque les concentrations fœtales en IGF peuvent être affectées par différents facteurs environnementaux. Notamment, l'IGF1 est fortement régulé par la disponibilité en acides aminés en période fœtale et post-natale précoce. Ainsi il a été montré, dans les modèles de dénutrition protéique fœtale chez les rongeurs, une diminution des niveaux sériques d'IGF1 (Thissen *et al.* 1994). C'est cette régulation particulière de l'IGF1 par les acides aminés que nous avons utilisés dans notre modèle murin afin d'induire un RCIU tout en essayant de ne pas trop induire d'effets additionnels dus à une diminution en calories (*i.e.* régime hypo-protéique iso-calorique).

Concernant les protéines de liaison aux IGFs (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein*, IGFBP), elles lient avec des affinités différentes IGF1 et IGF2, tous deux ubiquitaires, et ont un profil d'expression tissu-spécifique et dépendant du stade de développement, ce qui suggère qu'elles ont différents rôles dans le développement et la physiologie des tissus. Elles ont une fonction positive ou négative sur l'action des IGFs et possèdent une régulation d'expression propre (Jones and Clemmons 1995; Allan *et al.* 2001). Chez les humains, le poids à la naissance est positivement corrélé à la concentration plasmatique d'IGFBP-3 et inversement lié à celle d'IGFBP-1 (qui est aussi corrélée négativement à l'insulinémie). En cas de RCIU, il a été observé une concentration plasmatique élevée d'IGFBP-1 tandis que celles d'IGFBP-3 et d'IGF1 étaient diminuées (Straus *et al.* 1991; Giudice *et al.* 1995). Après la naissance, l'IGFBP-3 devient la protéine de liaison majoritaire et forme un complexe avec l'IGF1. Cette liaison permet d'augmenter la demi-vie de l'IGF1 et sert de réserve. En outre,

l'IGF1 et l'IGFBP3 forment un complexe ternaire avec une sous-unité *labile en condition acide* (ALS, *acid labil subunit*), ce qui accroît encore la demi-vie de l'IGF1. Ceci est notamment prépondérant en période post-natale car l'IGF1, l'IGFBP-3 et l'ALS sont tous trois stimulés par la GH.

b) L'Insuline

L'insuline est structurellement très proche de l'IGF1 et tous deux dérivent d'un orthologue commun. De même, le récepteur à l'insuline est très proche de l'IGF1R et tous deux activent les mêmes voies de signalisation intracellulaires (PI3K/AKT-MEK/ERK). Ainsi, l'insuline est également fortement impliquée dans la croissance fœtale, notamment par son action sur la disponibilité des nutriments et par son rôle anabolisant au niveau fœtal. En effet, l'insuline fœtale, sécrétée par les cellules β du pancréas, est essentielle pour l'absorption des nutriments. Les cellules β fœtales agissent en quelque sorte comme des capteurs des besoins nutritionnels et permettent de fournir le glucose nécessaire à la croissance du fœtus *via* la sécrétion d'insuline. En cas d'ablation des cellules β pancréatiques fœtales, il est observé une hyperglycémie et surtout une réduction de l'utilisation du glucose ce qui entraîne un retard de croissance du fœtus (Fowden and Hill 2001).

D'autre part, les niveaux d'insuline et d'IGF1 sont positivement corrélés et les deux hormones agissent en synergie afin d'augmenter la captation, dans les tissus fœtaux, de glucose et d'acides aminés. Il a été montré qu'une déficience en insuline fœtale, suite à une pancréatectomie, réduisait les taux d'IGF1 (mais pas ceux d'IGF2) dans le fœtus de la brebis. Et à l'inverse, une perfusion d'insuline augmente la concentration en IGF1 plasmatique, sans effet sur celle d'IGF2 (Fowden 2003).

c) Les Glucocorticoïdes

A l'inverse des IGFs et de l'insuline, les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur sur la croissance et affectent le développement de nombreux tissus. Lorsque les concentrations en glucocorticoïdes sont augmentées, la croissance du fœtus et la différenciation tissulaire sont affectées. En effet, il a été montré par exemple que la descendance de femmes exposées à la

prednisone durant la grossesse avait un plus petit poids que celle de femmes non exposées. Lors de cette même étude, les auteurs ont regardé les effets de la prednisone sur le développement foetal de rats et ont observé un retard de croissance chez les rats exposés *in utero* (Reinisch et al. 1978). Ce défaut pourrait impliquer le ratio prolifération / différenciation des cellules puisque les glucocorticoïdes sont connus pour induire la maturation de certains tissus (ex : les poumons). De plus, la surexposition aux glucocorticoïdes a également été associée dans des modèles murins ou ovins avec le développement d'une hypertension et d'une intolérance au glucose ultérieurement.

Chez l'Homme, la concentration basse en glucocorticoïdes chez le fœtus est maintenue grâce à l'action de la 11 β -HSD2 placentaire qui permet la conversion du cortisol et de la corticostérone en métabolites inactifs. De manière importante, l'activité de cette enzyme clé pour limiter l'exposition foetale aux glucocorticoïdes, est régulée par des facteurs nutritionnels et endocriniens (Fowden *et al.* 2006). En effet, de nombreuses conséquences précoces (retard de croissance...) et tardives (syndrome métabolique) peuvent être mimées par une exposition foetale accrue aux glucocorticoïdes ou *via* une inhibition de la 11 β -HSD2. Les glucocorticoïdes ont donc un rôle de médiateur des altérations nutritionnelles ou environnementales pendant la grossesse et permettent ainsi d'adapter ensuite le développement du fœtus.

De manière intéressante, il est à noter que l'impact d'une exposition du fœtus à un excès de glucocorticoïdes sur le développement de pathologies tardives comme l'hypertension artérielle n'est pas le même selon l'espèce étudiée. En effet, chez le rat, cet impact est plus important lorsque l'exposition survient en fin de gestation alors que chez la brebis, l'impact est plus délétère lorsque l'exposition est réalisée durant la période précoce de la gestation. Ces différences pourraient être liées aux différences dans le *timing* du développement des reins et du système cardiovasculaire chez ces deux espèces.

d) *Autres facteurs régulant le développement foetal*

De nombreux autres facteurs non cités ici ont également un impact sur le développement foetal. Ces facteurs peuvent être extrêmement variés (cf 4.c Etiologie du

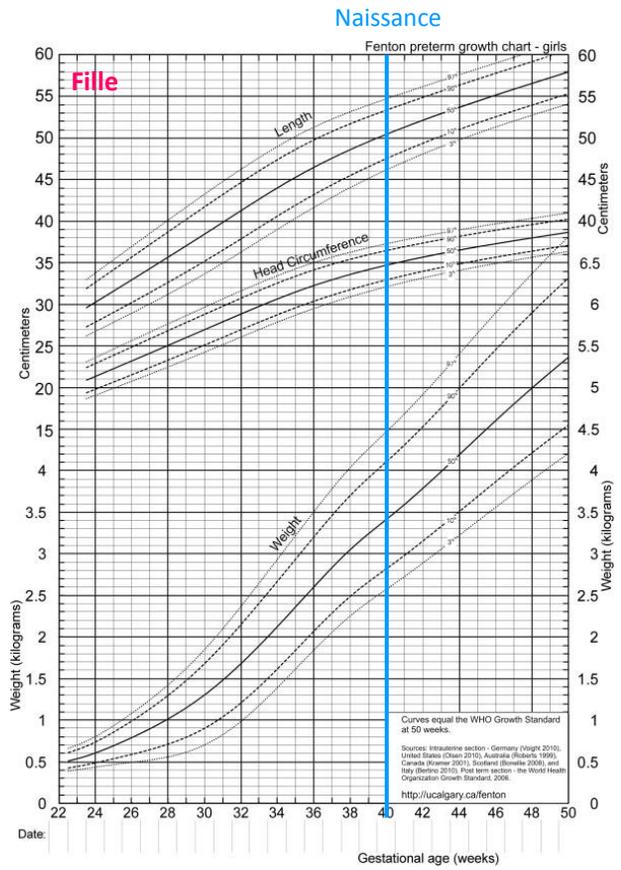
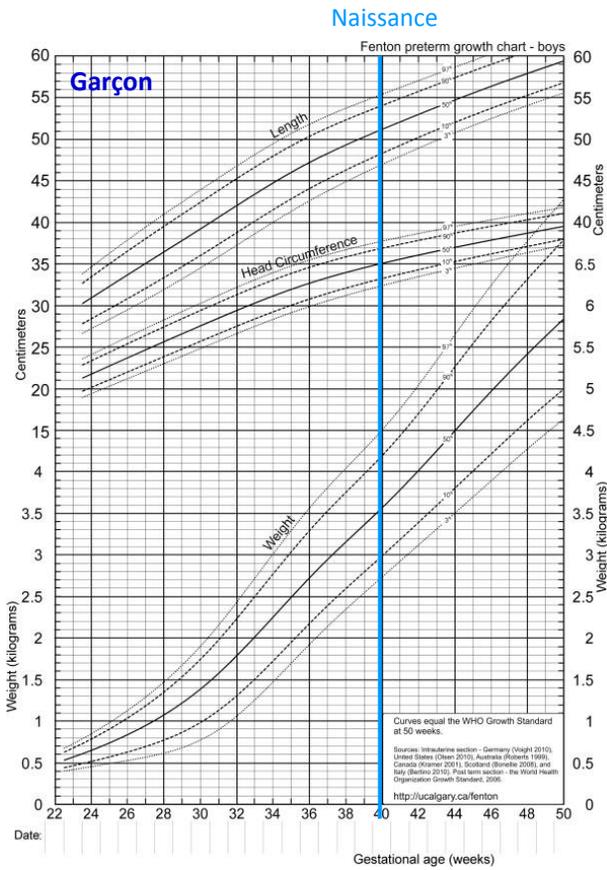


Figure 4 : Courbes de croissance fœtale et néonatale chez l'humain. Courbe de croissance pondérale, staturale et du tour de tête à partir de la 22^{ème} semaine de gestation jusqu'au premier mois de vie des garçons (gauche) et filles (droite).
D'après Fenton, TR and Kim, JH, 2013.

RCIU, page 27). A titre d'exemple la taille de la mère est un déterminant majeur de la taille du fœtus (Cogswell and Yip 1995). D'autre part, outre la consommation de drogues et d'alcool, l'âge de la mère lors de la gestation, associé à une augmentation de la prévalence de pré-éclampsie et de diabète gestationnel (Gilbert *et al.* 1999), la parité, associée à des risques de complications (Bai *et al.* 2002), et l'ensemble des éléments (socio-culturels inclus) pouvant moduler le régime alimentaire de la mère peuvent également influencer le développement fœtal et post-natal précoce de manière notable. En effet, la composition du régime alimentaire pouvant influencer sur la taille du bébé et du placenta à la naissance (Moore *et al.* 2004).

4. Altérations de la croissance fœtale

a) Généralités

Il existe de nombreux facteurs de risques pouvant altérer la croissance du fœtus : alcool, tabac, obésité, malnutrition de la mère, etc. Il est donc impératif de surveiller la croissance du fœtus afin de prévenir des potentiels risques. Pour cela, des courbes de croissance néonatale (**Figure 4**) (poids, taille ou périmètre crânien selon l'âge gestationnel) ont été réalisées afin de déterminer si le fœtus grandit de manière adaptée ou non (courbes d'Audipog par exemple) (Fenton and Kim 2013). Il existe néanmoins plusieurs définitions possibles pour un petit poids à la naissance. Un petit poids de naissance (LBW, *Low Birth Weight*) est défini par un poids inférieur à 2500 g pour une naissance à terme. Un enfant est considéré comme prématuré s'il naît avant 37 semaines d'aménorrhée (SA) et cela peut avoir un impact fort sur le poids à la naissance. Aussi, les courbes de croissance néonatale intègrent l'âge gestationnel. Là encore, un petit poids à la naissance pour l'âge gestationnel (PAG ou SGA, *Small for Gestational Age*) peut être défini par un poids dont la valeur est inférieure au 10^{ème} percentile à la naissance ou à une valeur inférieure à 2 déviations standards (DS) (Clayton *et al.* 2007). Ces deux définitions sont plus fréquemment utilisées par les néonatalogistes et les endocrinologues pédiatres respectivement. A l'inverse, la macrosomie fœtale est le terme définissant un nouveau-né avec un poids de naissance de plus de 4000g et un gros poids pour l'âge gestationnel (LGA, *Large for Gestational Age*) est défini par un poids supérieur au 90^{ème} percentile (Battaglia and Lubchenco 1967). La

définition du PAG se réfère donc aux mensurations à la naissance. Cette mesure est néanmoins un indicateur clé d'une potentielle altération de la croissance fœtale, notamment dans les cas où le suivi échographique n'a pu être réalisé avec la fréquence requise ou s'il n'a pas permis de déceler une altération.

Le RCIU est défini quant à lui par une diminution de la vitesse de croissance du fœtus. Le RCIU est donc une notion dynamique qui traduit un ralentissement de la croissance *in utero* du fœtus. Elle est évaluée au cours de suivis échographiques (biométries fœtales) (Rosenberg 2008). Chez l'Homme, le RCIU touche environ 5 à 7% des naissances dans les pays développés comme en Europe et en Amérique du Nord mais sa prévalence est plus élevée en Afrique et en Asie du Sud. Dans la majorité des cas, le RCIU est associé à un PAG à la naissance (Militello *et al.* 2009). On distingue deux types de RCIU : le RCIU de type 1, appelé harmonieux ou symétrique, touche 20 à 30% des RCIU et le type 2, appelé disharmonieux ou asymétrique, le plus fréquent. Le RCIU symétrique est caractérisé par une diminution homogène de la biométrie (squelette, tête et abdomen) et résulte généralement d'une altération précoce de la croissance fœtale. Il peut être dû à différentes causes telles que les maladies génétiques, les infections fœtales, les syndromes congénitaux ou à des effets toxiques. La division cellulaire et la croissance cellulaire sont affectées et indépendantes de l'apport de substrat. Pour ce groupe, le rattrapage de croissance est plus limité. Le RCIU asymétrique est caractérisé par une conservation du périmètre crânien mais avec une réduction de la croissance pondérale et possède une origine plus tardive (Wollmann 1998; Platz and Newman 2008).

b) Diagnostic du RCIU

Le RCIU étant une notion dynamique, plusieurs méthodes sont utilisées pour établir son diagnostic.

La mesure de la hauteur utérine est utilisée pour estimer la croissance du fœtus au cours de la grossesse et peut contribuer à dépister un fœtus RCIU car un défaut de croissance peut apparaître entre la 22^{ème} et la 32^{ème} SA.

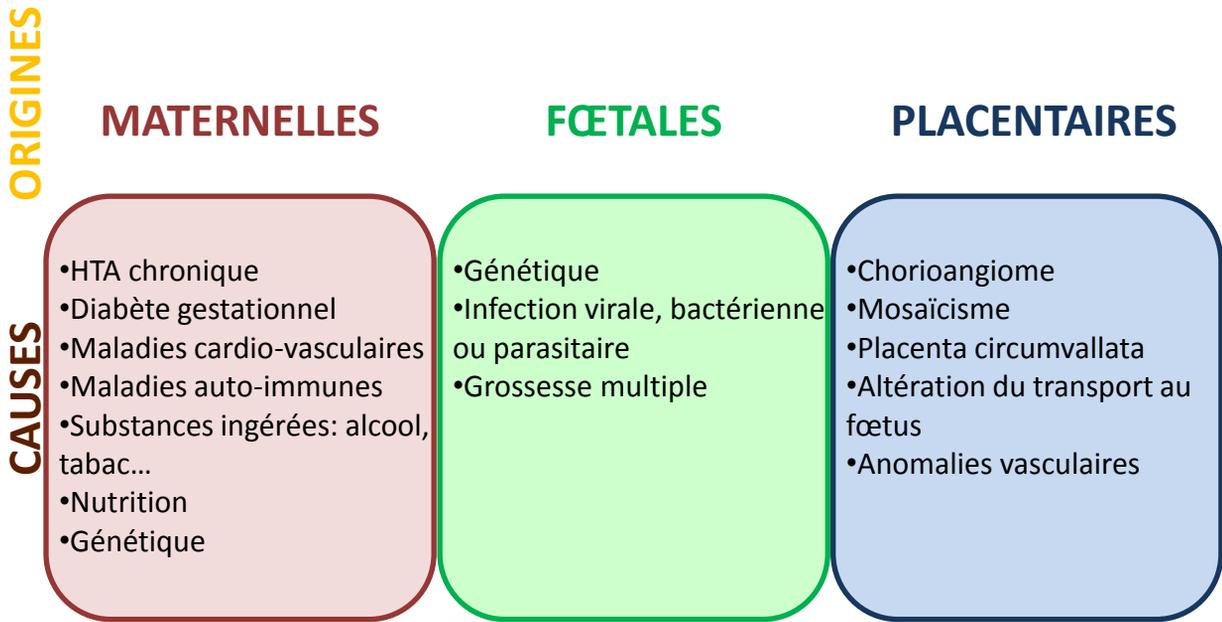


Figure 5 : Différentes origines du RCIU. Le retard de croissance peut avoir des origines maternelle, fœtale et placentaire.

D'après Hendrix, N and Berghella, V, 2008; Mandruzzato, GA *et al*, 2008; Wollmann, HA, 1998.

Dans une grossesse normale, trois échographies sont généralement effectuées (vers la 11-13^{ème} SA, vers la 22^{ème} SA et vers la 33^{ème} SA) permettant de donner la biométrie fœtale. Ainsi, en cas de hauteur utérine anormale, une échographie supplémentaire peut être réalisée. Si le RCIU est sévère et précoce, il peut être observé vers la 22^{ème} SA mais généralement, les RCIU sont diagnostiqués vers la 32-33^{ème} SA. Les paramètres biométriques échographiques recommandés sont le périmètre céphalique, le périmètre abdominal et la longueur fémorale. Ils permettent ainsi le calcul de l'estimation du poids fœtal qui est, avec le périmètre abdominal, le plus fiable pour le dépistage. Des courbes de croissance du fœtus (*in utero*) sont ensuite utilisées pour détecter une éventuelle anomalie dans la croissance fœtale. Il est important de noter que le sexe du fœtus est un facteur déterminant et que l'utilisation d'une courbe non différenciée par sexe conduit à surestimer les PAG chez les filles et les sous-estimer chez les garçons.

Suite à un diagnostic de RCIU, il faut établir l'origine de celui-ci et évaluer la vitalité fœtale et les possibilités de poursuite de la grossesse dans de bonnes conditions. En cas de diagnostic étiologique de RCIU, les modalités de surveillance fœtale doivent être adaptées à la sévérité du RCIU, à l'âge gestationnel et aux explorations vélocimétriques. L'échographie Doppler ombilical et le rythme cardiaque fœtal sont les premiers outils de surveillance à mettre en place. Si le maintien de la grossesse ne permet plus d'améliorer la survie fœtale, le déclenchement de l'accouchement ou une césarienne peut être réalisée. Si l'accouchement est réalisé avant 34 SA, un traitement par glucocorticoïdes peut être administré afin d'assurer la maturation des poumons du nouveau-né (*Recommandation pour la pratique clinique, élaborées par le Collège national des gynécologues et obstétriciens français, 2013*).

c) Etiologie du RCIU

Les causes du RCIU peuvent être d'origine fœtale, placentaire ou maternelle et 30% sont d'origine idiopathique (**Figure 5**).

Les origines fœtales peuvent être génétiques : anomalies chromosomiques comme le syndrome de Down ; infectieuses : virale, bactérienne ou parasitaire comme la toxoplasmose, la rubéole, la syphilis, ou dues à une malformation. En cas de grossesses

multiples, le risque de RCIU est nettement augmenté (Russell *et al.* 2007; Hendrix and Berghella 2008).

Les origines placentaires (chorioangiome, placenta circumvallata, mosaïcisme) et les anomalies vasculaires du placenta peuvent avoir des conséquences au niveau des échanges materno-fœtaux par une altération de la sécrétion d'hormones placentaires et par une capacité de transport inadéquate en oxygène et nutriments pour le fœtus pouvant mener à une pré-éclampsie (Hendrix and Berghella 2008).

Les causes maternelles sont multiples et sont aussi bien génétique (taille), médicale (hypertension artérielle, diabète gestationnel, maladies auto-immunes, etc.) qu'environnementale. Parmi les causes environnementales, l'exposition de la mère au tabac (cause environnementale majeure de RCIU), à l'alcool et/ou aux drogues induit une altération au niveau des échanges materno-fœtaux et un risque de RCIU pour le fœtus. De même, de nombreuses études ont été réalisées sur l'impact de la pollution sur la grossesse. Il a notamment été montré sur un modèle de lapin que l'inhalation durant la gestation de nanoparticules issues de gaz d'échappement entraînait une diminution de la vascularisation placentaire ainsi qu'une cassure dans la courbe de croissance de la descendance (Valentino *et al.* 2016). Ces données confirment une précédente étude prospective en France qui montrait que l'exposition maternelle durant la grossesse (pendant le 2^{ème} et 3^{ème} trimestre) au benzène -retrouvé dans l'air- était associée à une diminution du poids à la naissance et de la circonférence de la tête (Slama *et al.* 2009). La nutrition de la mère est aussi un des facteurs majeurs de la croissance fœtale. En effet, de nombreuses études ont pu mettre en évidence qu'une restriction nutritionnelle chez la mère (par exemple, l'exposition à la famine) pouvait entraîner une augmentation des risques de RCIU. Cet aspect sera abordé par la suite (Wollmann 1998; Hendrix and Berghella 2008; Mandruzzato *et al.* 2008).

Il est aussi important de noter que l'impact de l'environnement maternel sur la croissance fœtale dépend aussi de la fenêtre temporelle de la grossesse. Il a été montré, par exemple, qu'un déficit maternel en fer au cours du premier trimestre pouvait entraîner une diminution de la croissance fœtale et qu'elle est, en général, plus dommageable pour la grossesse qu'une anémie ferriprive au 2^{ème} ou 3^{ème} trimestre de grossesse. Ainsi, certaines études suggèrent une supplémentation en fer dès le début de grossesse afin de réduire le

risque de RCIU et d'accouchement prématuré pour les femmes en déficit de fer. Mais si les stocks de fer sont trop augmentés, il existe également un risque de complications maternelles tel qu'un diabète gestationnel ou un risque de pré-éclampsie (Scholl 2005; Abu-Saad and Fraser 2010). De même, des études ont permis d'établir un lien entre la prise d'acide folique en période péri-conceptuelle (1 mois avant la conception et pendant le début de grossesse) et une diminution des risques de développer un défaut de formation du tube neural (Ramakrishnan *et al.* 2012).

D'autre part, une bonne nutrition de la mère pendant la grossesse est primordiale pour le bon développement de son fœtus. En effet, un des déterminants clés de la croissance du fœtus est notamment la disponibilité en nutriments. Par exemple, les acides aminés sont essentiels au développement de certains organes et à la mise en place de l'axe somatotrope, en stimulant l'IGF1. Une déficience en un nutriment pourrait donc engendrer une altération de la croissance fœtale (Hales and Barker 1992). En plus de la quantité optimale, un facteur important de l'alimentation est l'équilibre entre les macronutriments et les micronutriments dans l'alimentation maternelle. Par exemple, Godfrey et ses collègues ont réalisé une enquête sous forme de questionnaire sur l'alimentation de femmes durant le 1^{er} et le dernier trimestre. Ils ont pu observer que l'enrichissement de l'alimentation des mères en carbohydrates en début de grossesse était associé à une diminution du poids de naissance et de celui du placenta. Cette diminution est d'autant plus importante si l'enrichissement en carbohydrates en début de grossesse est associé à une diminution du taux de protéines ingérées pendant le dernier trimestre de grossesse (Godfrey *et al.* 1996).

d) Complications associées au RCIU

Une altération de la croissance fœtale peut altérer la mise en place et la maturation fœtale de certains organes. Ainsi, le RCIU pourrait être le reflet d'atteintes développementales et fonctionnelles à l'origine de complications ultérieures, aussi bien à court qu'à long terme. Les complications à court terme peuvent être graves pour le fœtus et le nouveau-né. En effet, un RCIU augmente les risques de mort fœtale et néonatale. Durant la période néonatale, on observe notamment une augmentation des risques d'asphyxie périnatale, d'hypothermie, d'altération de la glycémie, d'hypertension et d'hémorragie

<u>OMS, 1998</u>	<u>EGIR, 1999</u>	<u>NCEP:ATPIII, 2001</u>	<u>AACE, 2003</u>	<u>IDF, 2005</u>
<p>Insulino-résistance ou hyperglycémie à jeun (>100mg/dl) ou intolérance au glucose et au moins deux des critères suivants:</p>	<p>Insulino-résistance (niveaux d'insuline supérieurs au 75^{ème} percentile de patients non diabétiques) et au moins deux des critères suivants:</p>	<p>Au moins trois des critères suivants:</p>	<p>Intolérance au glucose et au moins deux des critères suivants:</p>	<p>Obésité abdominale (critères spécifique selon l'éthnie ou présumée si IMC > 30 kg/m²) et au moins deux des critères suivants:</p>
<p>Obésité abdominale Ratio taille/hanches > 0.9 (homme) ou 0.85 (femme) ou IMC > 30 kg/m²</p>	<p>Tour de taille > 94 (homme) ou 80 cm (femme)</p>	<p>Tour de taille > 102 (homme) ou 88 cm (femme)</p>	<p>IMC > 25 kg/m²</p>	
<p>Dyslipidémie TG > 150 mg/dl et/ou HDL-C < 40 (homme) ou 50 mg/dl (femme)</p>	<p>Dyslipidémie TG > 150 mg/dl HDL-C < 39 mg/dl</p>	<p>Dyslipidémie TG > 150 mg/dl HDL-C < 40 (homme) ou 50 mg/dl (femme)</p>	<p>Dyslipidémie TG > 150 mg/dl et/ou HDL-C < 40 (homme) ou 50 mg/dl (femme)</p>	<p>Dyslipidémie TG > 150 mg/dl et/ou HDL-C < 40 (homme) ou 50 mg/dl (femme)</p>
<p>Pression artérielle > 140/90 mmHg</p>	<p>Pression artérielle > 140/90 mmHg</p>	<p>Pression artérielle > 130/85 mmHg</p>	<p>Pression artérielle > 130/85 mmHg</p>	<p>Pression artérielle > 130/85 mmHg</p>
<p>Microalbuminurie Taux de sécrétion d'albumine urinaire > 20 µg/min ou Ration albumine/créatinine > 30 mg/g</p>	<p>Hyperglycémie à jeun > 110 mg/dl</p>	<p>Hyperglycémie à jeun > 110 mg/dl > 100 mg/dl (2003)</p>		<p>Hyperglycémie à jeun > 100 mg/dl (2003)</p>

Tableau 1 : Critères d'appartenance au syndrome métabolique selon les différentes organisations.

Abréviations : OMS: Organisation Mondiale de la Santé ; EGIR : *European Group for the Study of Insulin Resistance* ; NCEP:ATPIII : *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* ; AACE : *American Association of Clinical Endocrinology* ; IDF : *International Diabetes Federation* ; IMC : Indice de Masse Corporelle ; TG : Triglycérides ; HDL-C : *High Density Lipoprotein - Cholesterol*.

D'après Kassi, E *et al* 2011.

pulmonaire et d'insuffisance rénale (Rosenberg 2008). Le RCIU constitue également un facteur de risque de troubles digestifs pouvant évoluer vers une entérocolite ulcéro-nécrosante. De même, à cause de l'hypoxie fœtale, la fréquence de rétinopathie du prématuré semble plus élevée chez les nourrissons nés avec un RCIU (Longo *et al.* 2013). A ces différentes complications peuvent s'ajouter celles d'un nouveau-né prématuré : une augmentation des risques respiratoires, d'entérocolite ulcéro-nécrosante et d'hémorragie cérébrale. Les comorbidités associées au RCIU sont d'autant plus accentuées si le bébé naît avec un PAG. Par exemple, une étude en 1999 a notamment montré que l'incidence du décès néonatal était près de 10 fois plus élevée chez des PAG sévères (ayant un poids égal ou inférieur au 3^{ème} percentile de la courbe de référence) (McIntire *et al.* 1999).

Ultérieurement, le RCIU peut entraîner une altération du système immunitaire (troubles infectieux) et des troubles respiratoires (Hack *et al.* 1991). Il peut aussi être associé à des troubles cognitifs, de la concentration et d'acquisition du langage (Hack *et al.* 1991). Ceci peut notamment entraîner une baisse de performance scolaire à l'adolescence. Une étude rétrospective australienne a permis de mettre en évidence que le risque de déficit intellectuel sévère était plus élevé en cas de RCIU (Leonard *et al.* 2008). Ainsi, le RCIU semble avoir un impact négatif sur le développement cognitif, neuro-développemental et comportemental et ce risque est plus accru si le RCIU est associé à un PAG sévère.

Le RCIU étant, dans la majorité des cas, associé à un petit poids de naissance, de nombreuses études épidémiologiques ont souvent associé directement le PAG aux pathologies cardio-métaboliques. Ces pathologies, regroupées sous le nom de syndrome métabolique, associent notamment l'hypertension artérielle, la résistance à l'insuline, l'obésité et la dyslipidémie (Jaquet *et al.* 2002; Gluckman and Hanson 2004). La première définition officielle du syndrome métabolique a été donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1998. Les individus présentant les critères suivants étaient considérés comme atteints d'un syndrome métabolique : une insulino-résistance, une hyperglycémie à jeun ou une intolérance au glucose et au moins deux critères parmi les suivants : une obésité abdominale, une dyslipidémie, une hypertension artérielle ou une microalbuminurie (**Tableau 1**). Par la suite, quatre autres définitions se sont succédées : celle de l'European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR ; 1999), du National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP:ATPIII ; 2001), de l'American Association of Clinical

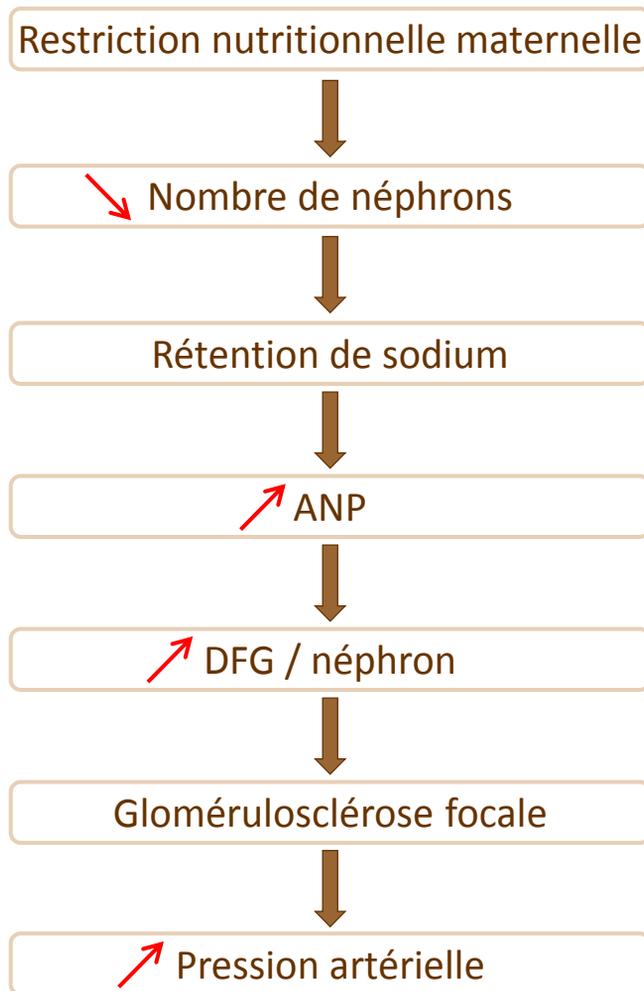


Figure 6 : Hypothèse du développement de l’hypertension à cause d’une sous-nutrition maternelle. La diminution du nombre de néphrons induit par la restriction maternelle contribuerait au développement de l’hypertension artérielle.

Abréviations: ANP, facteur natriurétique auriculaire; DFG, débit de filtration glomérulaire.

D’après McMillen, C and Robinson, JS, 2005 et Brenner, BM *et al*, 1988.

Endocrinology (AACE ; 2003) et de l'International Diabetes Federation (IDF ; 2005). Actuellement, les deux définitions les plus utilisées sont celles du NCEP : ATP III et de l'IDF, qui se concentrent sur le tour de taille (mesure de substitution de l'obésité centrale) alors que les trois autres sont plus axées sur la résistance à l'insuline. Au vue des difficultés d'unifier les critères, la définition de l'IDF propose une définition de l'obésité centrale en fonction de l'origine ethnique (Kassi *et al.* 2011).

Différentes études ont en effet lié un faible poids à la naissance à un risque accru d'hypertension artérielle à l'âge adulte. Cette dernière a été notamment associée à une augmentation de la résistance artérielle. L'hypertension artérielle chez les adultes nés avec un PAG pourrait avoir de multiples origines. Le nombre d'unités fonctionnelles du rein est acquis au cours de la vie fœtale. Un nombre moins important de néphrons à la naissance persisterait donc tout au long de la vie. Dans une étude de 1992, il a été montré que le nombre de néphrons était réduit chez des bébés nés avec un RCIU et décédés à la naissance ou dans la première année de vie (Hinchliffe *et al.* 1992). Un nombre de néphrons réduit a également été mis en évidence chez les patients âgés de 35 à 59 ans, présentant une hypertension (Keller *et al.* 2003). De plus, Brenner et ses collègues ont proposé en 1988 que l'hypertension pourrait être due à une rétention de sodium suite à une filtration réduite (**Figure 6**). En effet, si les individus présentent une capacité réduite à excréter le sodium, cela pourrait induire une augmentation des niveaux du facteur natriurétique auriculaire (ANP, Atrial Natriuretic Peptide) qui est une hormone augmentant les taux de filtration glomérulaire et donc le taux de filtration glomérulaire par néphron. Cette augmentation pourrait donc potentiellement induire une glomérulosclérose focale et augmenter également la probabilité de développer une hypertension (Brenner *et al.* 1988).

D'autre part, un petit poids de naissance a aussi été associé à une diminution du diamètre des artères coronaires et aortique ainsi que du diamètre du canal d'éjection ventriculaire gauche chez des enfants de 9 ans. Ces données suggèrent qu'une croissance fœtale altérée pourrait avoir des effets persistants sur la structure du cœur et des gros vaisseaux. Ceci est un facteur de risque supplémentaire dans la survenue d'altérations cardiovasculaires comme l'athérosclérose (Jiang *et al.* 2006).

Une période clé dans l'émergence des complications à long terme semble être la période post-natale précoce, où la prise en charge semble influencer fortement. En effet, à la naissance, les nouveau-nés RCIU ont des besoins en soins médicaux spécifiques car ils présentent un risque élevé de morbidité et de mortalité en période post-natale précoce. Les principaux problèmes immédiats comprennent la prise en charge de l'hypoglycémie et de l'hypothermie. Les nouveau-nés RCIU ou PAG doivent donc recevoir des soins nutritionnels spécifiques par voie entérale et parentérale, associés à l'allaitement lorsque cela est possible, qui sont nécessaires afin de stimuler le développement cognitif et réduire les risques d'infections. Les nouveau-nés prématurés sont bien définis et suivent les recommandations conjointes de l'ESPEN (*European Society for Parenteral and Enteral Nutrition*) et l'ESPGHAN (*European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) afin de répondre aux besoins énergétiques du fœtus, c'est-à-dire les besoins en protéines, en glucose et lipides (Lapillonne *et al.* 2011). Cependant, il n'y a pas de recommandations claires pour les nouveau-nés RCIU ou PAG. De nos jours, ces derniers sont nourris selon un protocole plus doux que ceux nés avec une prématurité. En effet, les néonatalogistes recommandent d'éviter toute restriction nutritionnelle potentielle, car avoir un bon développement cérébral reste l'objectif principal. Cependant, un équilibre délicat doit être encore trouvé car de nombreuses données indiquent que la récupération rapide du poids suite à la suralimentation a probablement des effets délétères à long terme (Ong *et al.* 2000), et notamment métaboliques. Ma thèse portant sur les altérations métaboliques suites à un RCIU chez la souris, ces complications sont présentées ci-dessous dans un chapitre particulier.

e) Complications métaboliques associées à un RCIU

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, de nombreuses études ont associé le RCIU au développement d'un syndrome métabolique à l'âge adulte. De nombreuses études, notamment sur les cohortes anglaises d'hommes et de femmes de plus de 45 ans, ont montré un lien entre petit poids de naissance et des concentrations de LDL augmentée et de HDL diminuée. De plus, ces personnes avaient aussi une insulïnémie ainsi qu'une concentration en triglycérides à jeun élevées (Barker *et al.* 1993). Les altérations

métaboliques chez les adultes nés avec un PAG pourraient avoir de multiples origines. Néanmoins, une étude sur une petite cohorte d'enfants pré-pubères nés avec un RCIU a indiqué que ces derniers ne présentaient pas d'altération de la tolérance au glucose mais avaient une altération de la sensibilité à l'insuline qui pourrait être un marqueur prédictif du développement de diabète de type 2 à l'âge adulte (Hofman *et al.* 1997). Dans le même sens, une étude en France a indiqué que les individus nés avec un PAG présentaient une augmentation plus importante de la concentration en insuline et de la glycémie après un bolus de glucose à l'âge de 20 ans. Ces données confirment une association entre les individus nés avec un PAG et le potentiel développement de pathologies métaboliques à l'âge adulte telle qu'une hyper-insulinémie visible dès 20 ans. Des mesures pourraient être prises afin de prévenir le développement du diabète de type 2 (Leger *et al.* 1997).

Les altérations métaboliques induites par le RCIU ainsi que les mécanismes impliqués ont été étudiés sur divers modèles animaux. Ces modèles animaux de RCIU sont basés sur des restrictions alimentaires ou l'induction d'un stress chez la femelle gestante, ou des restrictions du flux sanguin au niveau du placenta par ligature des artères utérines (provoquant une réduction de l'apport en nutriments et en oxygène). En outre, l'induction d'un diabète ou d'une obésité chez la mère peut également induire un RCIU –ou une macrosomie– dans certains cas (Gabory *et al.* 2016). Pour les modèles animaux de restriction alimentaire, deux stratégies ont été utilisées : une restriction alimentaire globale ou une alimentation iso-calorique appauvrie en protéines (Charles *et al.* 2016). Les altérations métaboliques engendrées par le RCIU peuvent impliquer la prise alimentaire *per se* ainsi que le métabolisme énergétique. Ainsi, une dérégulation de la prise alimentaire pourrait refléter une altération au niveau de l'hypothalamus et une dérégulation du métabolisme énergétique pourrait refléter en plus une atteinte au niveau du pancréas, des tissus adipeux, des muscles et du foie.

Ainsi, une hyperphagie a été mise en évidence dans plusieurs modèles de RCIU (Vickers *et al.* 2000; Lopes de Souza *et al.* 2008; Orozco-Solis *et al.* 2009; Watez *et al.* 2014) et pourrait refléter un défaut de développement des neurones hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Celle-ci est en effet en partie régulée par les neurones à NPY/AgRP (*Neuropeptide Y/Agouti-related Protein*) et POMC/CART (*Pro-opiomelanocortine/Cocaine and Amphetamine Related Transcript*) localisés dans le noyau arqué de l'hypothalamus

(ARC), et dont le développement est fortement dépendant de la signalisation leptinergique (Bouret *et al.* 2004; Delahaye *et al.* 2008). Néanmoins, ces neurones semblent également être impactés lors d'un régime hypo-protéique (Coupe *et al.* 2010; Plagemann *et al.* 2010), suggérant que potentiellement d'autres facteurs dépendant des acides aminés (ex : insuline) pourraient réguler leurs développements (Vogt *et al.* 2014).

Concernant les altérations métaboliques, on retrouve très fréquemment une hyperleptinémie et le développement d'une intolérance au glucose avec une résistance à l'insuline avec l'âge suite à un RCIU. Ces dernières impliquent des altérations développementales du pancréas ainsi que des atteintes au niveau des organes insulino-sensibles. Au niveau du pancréas, une restriction calorique de 50% durant la dernière semaine de gestation chez la ratte a été associée à une masse de cellules β et un contenu en insuline dans le pancréas diminués chez les rats de manière permanente (diminution de 40% de la masse de cellules β et diminution de 25% du contenu insulinique à P21) (Garofano *et al.* 1997). Une altération similaire a été trouvée dans les modèles utilisant des régimes hypo-protéiques iso-caloriques (-50% de protéines) durant l'ensemble de la gestation (Snoeck *et al.* 1990), ou durant les périodes de gestation et lactation, et a été associée à une augmentation du contenu en glucagon, ce qui pourrait suggérer une potentielle compensation (Petrik *et al.* 1999). La diminution de la masse β pourrait impliquer une altération dans la balance entre la prolifération et l'apoptose des cellules β pancréatiques (Arantes *et al.* 2002; Stoffers *et al.* 2003); et de leur morphologie. Chez les rongeurs, les périodes anté- et post-natales sont toutes deux critiques (Berney *et al.* 1997).

Au niveau des tissus insulino-sensibles, il a été rapporté qu'une restriction de la nutrition maternelle durant la gestation pouvait diminuer le nombre de certaines fibres musculaires (Dwyer and Stickland 1992). De plus, chez les rats adultes, dont la mère était sous régime hypo-protéique durant la gestation, présentant une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline, il a été mis en évidence un défaut d'absorption du glucose au niveau musculaire associé à une diminution de l'expression de la PKC ζ (Protéine Kinase C zêta) (Ozanne *et al.* 2003). Ces atteintes peuvent se produire en parallèle d'altérations au niveau des tissus adipeux, dont la différenciation des progéniteurs en adipocytes a lieu en période périnatale et dépend en partie de la leptine. En effet, la leptine activerait l'adipogenèse en favorisant la différenciation des préadipocytes et aurait des effets

lipolytiques sur les adipocytes matures. Ces modifications des capacités de stockages (Breton 2013) seraient de plus associées à des modifications d'expressions géniques favorisant la lipogenèse *de novo* et le stockage des graisses. En effet, une étude portant sur un modèle de ratte gestante nourrie avec 30% de leur besoin énergétique quotidien a montré que la sous nutrition maternelle induit sur sa descendance mâle une augmentation d'*Acc* (*Acetyl-CoA carboxylase*) et *Fas* (*Fatty Acid Synthase*), impliqués dans la lipogenèse *de novo*, dans le tissu adipeux gonadique et dans le tissu adipeux péri-rénal, et de *Srebp-1c/Add1* (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c/Adipocyte Determination Differentiation-dependant factor 1*), impliqué dans le métabolisme des acides gras, dans le tissu adipeux péri-rénal (Lukaszewski *et al.* 2011). Ces modifications du métabolisme lipidique sont en accord avec le concept de la *PAR*, programmant l'organisme à évoluer dans un environnement pauvre en période post-natale.

Enfin au niveau hépatique, une dénutrition de la mère par un régime hypo-protéique durant la période de gestation ou toute la période périnatale semble affecter de manière permanente la régulation d'enzymes clés pour le métabolisme, mais aussi la structure du foie de la descendance (Desai *et al.* 1995; Desai *et al.* 1997). En effet, le foie, qui est impliqué dans le métabolisme des glucides (néoglucogenèse, glycogénolyse ou glycogénogenèse) et des lipides (synthèse de triglycérides, synthèse et dégradation du cholestérol), est un organe complexe. L'unité structurelle et fonctionnelle du foie est le lobule hépatique organisé en fonction de la trajectoire des vaisseaux sanguins. L'hépatocyte n'est pas le seul type cellulaire constituant le foie mais est le majoritaire. Au centre de chaque lobule hépatique, une veine centrolobulaire collecte le sang qui quitte le lobule. Suite à un RCIU induit par un régime hypo-protéique de la ratte gestante, on observe une diminution de l'activité de l'enzyme GK (Glucokinase), enzyme clé catalysant la phosphorylation du glucose en G6P (Glucose-6-Phosphate) et exprimée plutôt autour de la veine hépatique, et une augmentation de la PECK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), impliquée dans la néoglucogenèse, et exprimée plutôt autour de la veine porte et du canal biliaire. Néanmoins, ces altérations semblent dues à des atteintes durant la période fœtale car elles ne sont pas retrouvées si elles sont réalisées en période de lactation uniquement. D'autre part, la restriction protéique durant la période périnatale a aussi un impact sur la production hépatique de glucose. En effet, chez ces rats, les auteurs ont évalué la réponse des foies

perfusés à une stimulation à l'insuline et n'ont pas observé l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de glucose suggérant que la restriction protéique affectait la capacité de l'insuline à réduire la production hépatique de glucose dans la descendance (Ozanne et al. 1996). Pour le métabolisme lipidique au niveau hépatique, une étude a notamment montré que la prévalence d'enfants nés avec un PAG présentant une stéatohépatite non-alcoolique (NAFLD, *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) était 4 fois plus importante que celle d'enfants nés avec un PAG sans complication (Alisi et al. 2011). De plus, il a été montré qu'une restriction calorique de 50% à partir du 10^{ème} jour de gestation chez le rat entraînait dans la descendance une augmentation du contenu en triglycérides hépatiques à l'âge de 9 mois. Celle-ci était associée à altération du métabolisme des lipides avec une diminution de l'expression des protéines PPAR α et PPAR γ et une augmentation de SREBP1 et FAS (Magee et al. 2008). De manière intéressante, ce même groupe a montré que des dépôts de graisse hépatique ainsi qu'une augmentation de l'expression de SREBP1c et FAS étaient présents dans les fœtus de rats dès le 20^{ème} jour embryonnaire malgré un environnement restreint. Ainsi, cette étude suggèrerait que la descendance de mère sous restriction calorique naîtrait avec une altération du métabolisme lipidique (Yamada et al. 2011). Des résultats similaires ont été obtenus avec un modèle de restriction protéique durant toute la gestation, où la descendance présentait à 18 mois une stéatose hépatique associée à une augmentation des contenus hépatiques en triglycérides, une augmentation de l'ARNm de SREBP1c, FAS et ACC-1 et une diminution d'IRS-2 et PPAR α (Erhuma et al. 2007). Ces différentes études pourraient être en accord avec un phénotype *économe* de la progéniture exposée à la restriction *in utero* afin d'augmenter son stockage de lipides pour s'adapter à la vie extérieure, qui pourrait ainsi être prédisposée à développer une stéatose hépatique (Itoh and Kanayama 2018).

f) Complications selon la période d'atteinte fœtale

Les modèles de régime hypo-protéique sur la programmation fœtale ont été très utilisés pour étudier les mécanismes reliant la nutrition maternelle avec le développement du syndrome métabolique à l'âge adulte, et peuvent engendrer des conséquences différentes des régimes hypocaloriques. De manière intéressante, la composition des

Nature du stress	Période du stress	Espèce	Phénotype	Référence
Restriction calorique de 70%	Gestation E1 à E21	Rat	Hyper-leptinémie, hyper-insulinémie (état non à jeun), altération du rythme de la prise alimentaire	Breton 2009
Restriction calorique de 70%	Gestation E1 à E21	Rat	Hyperphagie, hypertension artérielle, hyper-leptinémie, hyper-insulinémie	Vickers 2000
Restriction calorique de 50%	Gestation et lactation E14 à J21	Rat	J21: diminution du poids corporel et de la leptinémie J24: hyperphagie	Delahaye 2010
Restriction calorique de 50%	Gestation et/ou lactation E14 à J21 et J1 à J21	Rat	Diminution du poids corporel, hyperphagie, hyper-leptinémie, hypertension artérielle, augmentation de la fréquence cardiaque	Wattez 2014
Restriction calorique et/ou protéique CER: restriction calorique de 50% PR: restriction protéique (5% vs 15%) PER: restriction protéique et calorique	Gestation E14,5 à E21,5	Rat	E21,5, pour tous les régimes: diminution de la masse de cellules β , diminution du poids du placenta et du fœtus 8 semaines, PR: diminution de la masse de cellules β et du contenu en insuline	Bertin 1999 Bertin 2002
Restriction protéique (9% vs 18%)	Gestation E0 à E7 E8 à E14 E15 à E22 E0 à E22	Rat	Augmentation du poids corporel, hypertension artérielle	Langley-Evans 1996
Restriction protéique (9% vs 18%)	Gestation E1 à E21	Rat	Hypertension artérielle	Nwagwu 2000
Restriction protéique (8% vs 20%)	Gestation E1 à E22	Rat	Diminution du poids de naissance, de la prolifération des cellules β et de la taille des îlots pancréatiques	Snoeck 1990
Restriction protéique (8% vs 20%)	Gestation et/ou lactation CC: régime contrôle de E1 à J21 RR: régime restreint de E1 à J21 RC: régime restreint de E1 à E21	Rat	RC: rattrapage de la croissance dès J5 J22, RR: hypo-insulinémie, diminution des triglycérides 5 mois, RR: diminution du poids corporel et de celui des tissus adipeux viscéral, épидidymal et rétro-péritonéal, hypo-leptinémie 5 mois, RC: augmentation du poids du tissu adipeux viscéral et de la taille des adipocytes	Coupe 2009 Coupe 2010 Coupe 2012
Restriction protéique (10% vs 20%)	Gestation et/ou lactation: CC/CR/RR/RC	Rat	RR et CR: diminution du poids corporel RC: augmentation de l'index de résistance à l'insuline, hyper-leptinémie, hyper-insulinémie, rattrapage du poids corporel des rats contrôlés	Zambrano 2006
Restriction protéique (8% vs 20%)	Gestation et lactation E1 à J21	Rat	Hyperphagie transitoire, rattrapage de la croissance, altération du rythme de la prise alimentaire, augmentation du poids du tissu adipeux abdominal	Orozco 2009
Restriction protéique (8% vs 20%)	Gestation et lactation E1 à J21	Rat	J35: diminution du poids corporel, hyperphagie	Lopes de Souza 2008
Restriction protéique (8% vs 20%)	Gestation et lactation E1 à J21	Rat	J14: diminution du poids du pancréas, de la masse de cellules β et du contenu en insuline associée à une augmentation de l'apoptose des cellules des îlots pancréatiques et du contenu en glucagon	Petrik 1999
Restriction protéique (8% vs 20%)	Gestation et/ou lactation LP: E1 à J21 Post-natale LP: J1 à J21 Pré-natale LP: E1 à E22	Rat	J21: diminution du poids du pancréas, de la masse de cellules β et du contenu en insuline quelque soit la période d'exposition	Berney 1997
Restriction protéique (9% vs 18%)	Pré-implantatoire: E0 à E4,25	Rat	Mâles: hypertension artérielle Femelles: diminution du poids de naissance	Kwong 2000
Restriction protéique (9% vs 18%)	Périsconceptuelle: -3,5 à E0 et E0 à E3,5	Souris	Hypertension artérielle	Watkins 2011
Changement de taille des portées	Lactation J1 à J21	Rats	Plus le nombre de petits dans la portée est grand, plus basse est la consommation de nourriture après le sevrage	Oscar 1978
Changement de taille des portées	Lactation J1 à J21	Rats	3/4 petits par mère: augmentation du poids corporel, hyperphagie, hypertension artérielle	Plagemann 1992
Changement de taille des portées	Lactation J1 à J21	Souris	3 petits par mère: augmentation du poids corporel, hypertension artérielle 10 petits par mère: diminution du poids corporel, hypo-insulinémie, hypertension artérielle	Kappeler 2009

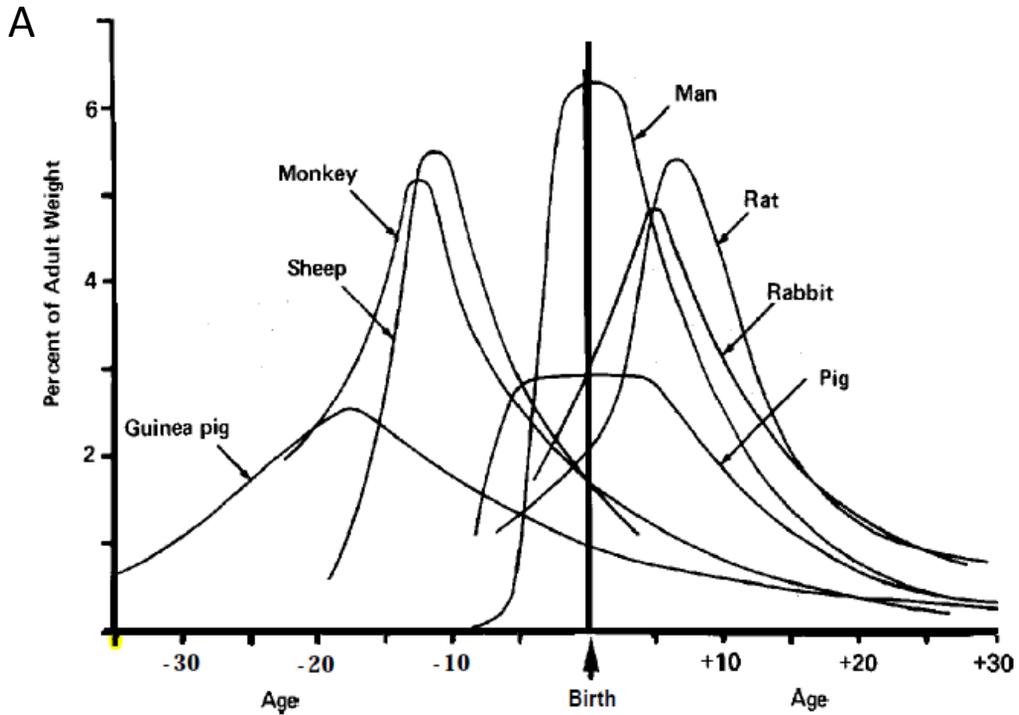
Tableau 2 : Conséquences à long terme d'une restriction nutritionnelle durant la période fœtale et/ou post-natale précoce sur le phénotype de la descendance.

Abréviations : E : jour embryonnaire ; J : jour post-natal.

régimes hypo-protéiques peut varier selon les laboratoires et semble prédisposer la descendance à différents effets à l'âge adulte. Par exemple, Langley-Evans a comparé deux régimes utilisés en Angleterre : le régime hypo-protéique qu'il utilise, appelé le « régime Southampton », contient plus de graisses et de méthionine que celui utilisé par l'équipe d'Hales, le « régime Hope Farm ». Il a mis en évidence que les ratons nés de mères sous régime hypo-protéique *Southampton* développaient une hypertension artérielle dès l'âge de 4 semaines alors que l'augmentation de la pression systolique des ratons nés de mères sous régime hypo-protéique *Hope Farm* n'était pas statistiquement significative. Ainsi, la nature d'une dénutrition durant la gestation (totale vs. ciblée) peut donc provoquer des effets différents sur la descendance. De plus, la composition en nutriments dans les régimes hypo-protéiques semble également influencer les effets à long terme (Langley-Evans 2000).

En outre, l'étude des effets métaboliques suite à un RCIU est également rendue délicate car les différents organes se développent durant des fenêtres de croissance différentes, et qui sont propres à chaque espèce. Ainsi, une modification de l'environnement fœtal induisant un RCIU pourrait altérer le développement de plus ou moins d'organes selon la fenêtre de développement touchée. A partir des principaux modèles murins listés de manière non-exhaustive (**Tableau 2**), il est délicat de pronostiquer une altération sélective en fonction de la période gestationnelle impactée. En effet, une hypertension artérielle chez le rat a été observée de manière quasi-systématique. Celle-ci a été observée lors de restrictions caloriques durant les périodes gestationnelles et de lactation (Wattez *et al.* 2014), mais également lors de restrictions en période de lactation uniquement. D'autre part, l'induction de RCIU par un régime maternel hypo-protéique durant la gestation uniquement a également été associé à une hypertension artérielle dans la descendance adulte (Langley-Evans *et al.* 1996; Nwagwu *et al.* 2000). De plus, cette hypertension a été observée si la femelle gestante était exposée au régime hypo-protéique durant toute la période de gestation ou bien uniquement lors de la 1^{ère}, la 2^{nde} ou la 3^{ème} semaine de gestation (Langley-Evans *et al.* 1996). De même, une altération en période péri-conceptuelle a également été associée avec une HTA malgré une exposition extrêmement courte (Kwong *et al.* 2000; Watkins *et al.* 2011).

Concernant les altérations métaboliques, les atteintes pancréatiques semblent elles aussi très sensibles aux modifications nutritionnelles durant toute la période périnatale,



B

Espèces	% du poids adulte à la naissance
Singe	76
Cobaye	61
Mouton	53
Homme	27
Cochon	25
Lapin	15
Rat	12

Figure 7 : Vitesse de Croissance du cerveau selon les espèces. Les vitesses de croissance du cerveau (**A**) de 7 espèces de mammifères exprimées en gain de poids du cerveau par rapport au poids adulte en fonction de l'âge. Les unités de temps : cobaye et rat : jour ; lapin : 2 jours ; singe : 4 jours ; mouton : 5 jours ; cochon : semaine ; homme : mois. Le pourcentage du poids du cerveau adulte atteint à la naissance (**B**) est donné pour chaque espèce.

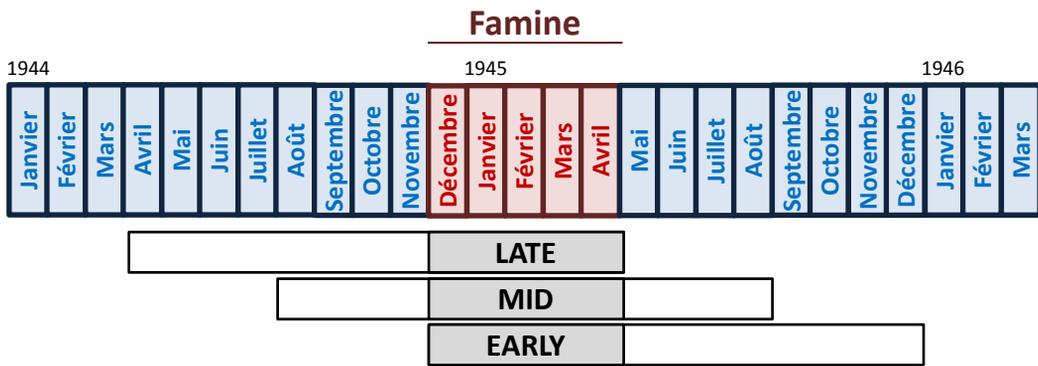
D'après Dobbing, J and Sands, J, 1979.

foétale et post-natale précoce incluses (Snoeck *et al.* 1990; Bertin *et al.* 1999; Bertin *et al.* 2002; McMillen and Robinson 2005; Zambrano *et al.* 2006). L'induction d'une hyperleptinémie (ou ARNm augmenté) dans la descendance adulte semble majoritairement associée à une exposition maternelle à des régimes hypocaloriques ou hypo-protéiques durant la gestation uniquement (Vickers *et al.* 2000; Zambrano *et al.* 2006; Breton *et al.* 2009; Coupe *et al.* 2010; Coupe *et al.* 2012), alors qu'une exposition incluant la période post-natale semble plus associée à une diminution des taux de leptine dans la descendance (Zambrano *et al.* 2006; Coupe *et al.* 2010; Coupe *et al.* 2012).

Il est à noter que l'extrapolation des résultats obtenus dans les divers modèles murins vers l'Homme est délicate car la chronologie de maturation des organes est différente. En effet, le modèle murin est immature à la naissance et les organes continuent de se développer en période post-natale précoce. Ainsi la lactation chez la souris s'apparente plus à une fin de gestation chez l'humain pour un certain nombre de systèmes. Par exemple, le développement du cerveau présente une vitesse de croissance qui ne se situe pas au même moment par rapport à la naissance selon les différentes espèces (**Figure 7**) (Dobbing and Sands 1979). Ce facteur nécessite d'être pris en compte.

Chez l'Homme, les données provenant de la cohorte de femmes hollandaises enceintes durant la période de famine de la seconde guerre mondiale a permis de mettre en évidence certains impacts. De nombreuses études épidémiologiques ont ainsi été réalisées sur cette population et ont mis en évidence qu'une sous-nutrition entraînerait chez l'Homme une altération de la croissance foétale et un petit poids de naissance, associés au développement d'un syndrome métabolique à l'âge adulte. Ces données suggèrent également que plus l'exposition débiterait précocement et plus le syndrome métabolique serait sévère (**Figure 8**). En effet, il a été rapporté qu'une exposition à la famine de la mère durant la fin de sa gestation entraînait une augmentation de la prévalence d'intolérance au glucose dans sa descendance. Si l'exposition se produisait en milieu de gestation, la descendance présentait en plus de l'intolérance au glucose, une augmentation de la prévalence à développer des maladies obstructives des voies respiratoires et à une augmentation d'une microalbuminurie à l'âge adulte. La descendance des femmes exposées à la famine au début de leur grossesse a été la plus impactée puisqu'à l'âge adulte, elle présentait une augmentation des risques de développer une intolérance au glucose, un

A



B

Exposition à la famine

LATE	MID	EARLY
Intolérance au glucose	Intolérance au glucose	Intolérance au glucose
	Microalbuminurie	Profil lipidique athérogène
	Maladies obstructives des voies respiratoires	Maladies coronariennes
		Obésité (chez la femme)
		Altération de la coagulation sanguine
		Cancer du sein

Figure 8 : Différentes conséquences à long terme de la descendance de la cohorte néerlandaise. Représentation de la cohorte néerlandaise exposée à la famine (A). Moment de l'exposition des femmes à la famine selon la période de leur grossesse (Late/Mid/Early). Conséquences à long terme (B) de l'exposition à la famine en fonction du moment de la grossesse.

D'après Roseboom, TJ *et al*, 2006.

profil lipidique plus athérogène, des maladies coronariennes ou encore une obésité chez la femme (Roseboom *et al.* 2006). Roseboom a également mis en évidence que, pour une atteinte durant le 3^{ème} trimestre, la pression artérielle était plutôt affectée par de petites variations dans le ratio protéines/carbohydrates de l'alimentation maternelle que par des variations des valeurs absolues en protéines, carbohydrates, calories ou graisses ingérés. Cela suggère que le dernier trimestre serait une période critique dans l'alimentation maternelle pour le développement d'une hypertension (Roseboom *et al.* 2001).

C. Croissance post-natale

Comme indiqué plus haut, l'environnement post-natal précoce influence fortement la susceptibilité de l'organisme au développement de pathologies ultérieures. Les organismes, encore en développement à la naissance, présentent une grande plasticité. Ceci est d'autant plus vrai pour les rongeurs par exemple. Tout comme le RCIU en période fœtale, la croissance en période post-natale intègre le développement et la maturation fonctionnelle de nombreux organes dont les altérations peuvent renforcer ou tempérer les dommages induits *in utero*. D'une manière générale, la croissance post-natale chez l'Homme se divise en 3 phases : une première phase, de la naissance à environ 2-3 ans, durant laquelle la vitesse de croissance est très élevée. Une seconde phase allant jusqu'à la puberté, où la vitesse de croissance diminue et devient plus régulière. La troisième phase implique une dernière poussée de croissance qui se déroule durant la puberté, et qui est donc à un âge différent selon le sexe. Elle démarre souvent plus tôt chez la fille. Elle est plus tardive chez le garçon mais la vitesse de croissance et le gain final de taille sont plus importants.

La croissance post-natale est fortement contrôlée par des facteurs génétiques. Elle est aussi sous contrôle endocrinien et peut donc être modulée par plusieurs facteurs hormonaux. De plus, la croissance peut être régulée par des facteurs environnementaux. Ceux-ci peuvent impliquer les conditions socio-économiques ou la nutrition. La surveillance de la croissance post-natale est essentielle pour dépister tous troubles sous-jacents. Pour

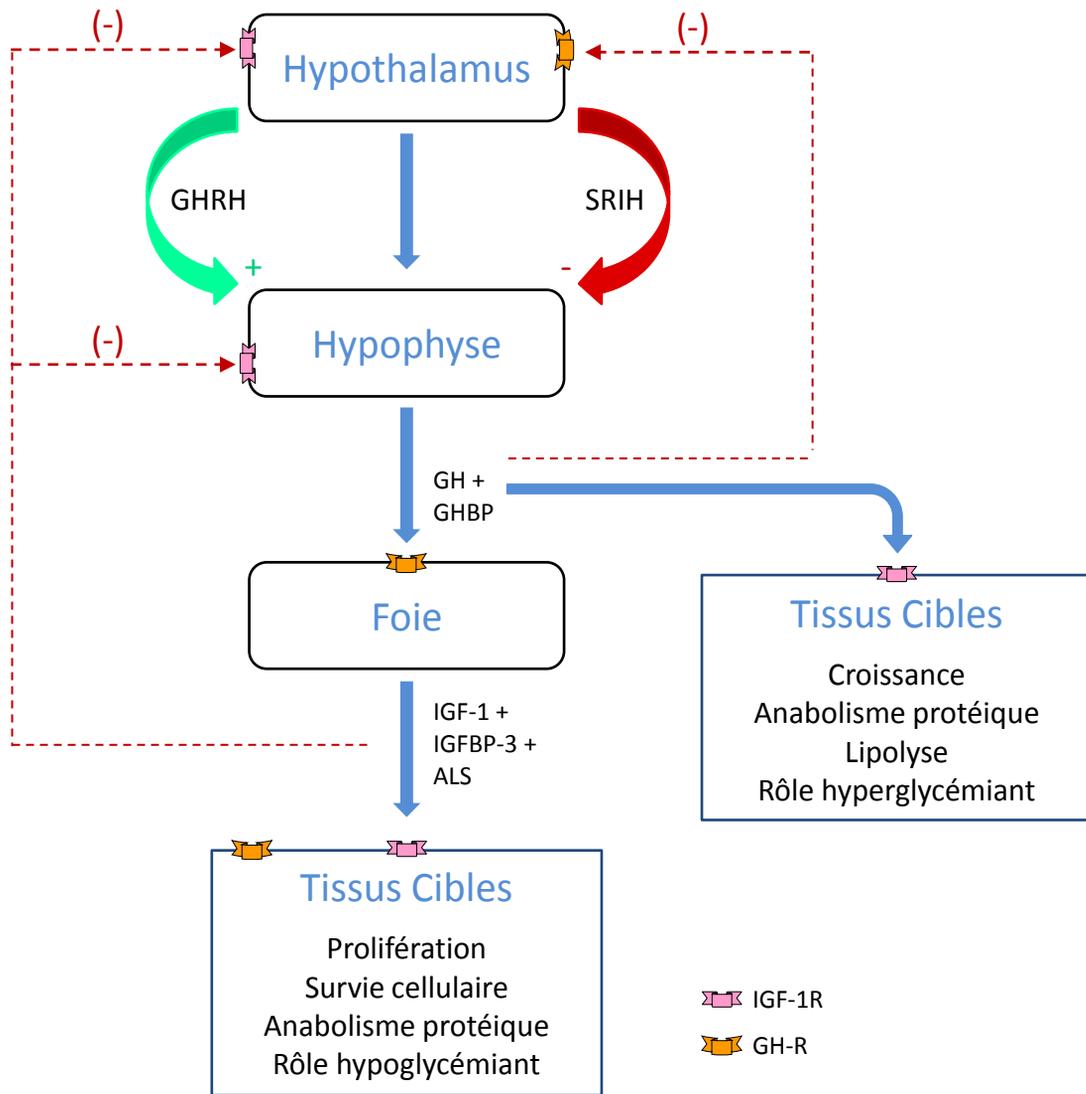


Figure 9 : Représentation schématique de l'axe somatotrope. Le GHRH hypothalamique active la sécrétion de GH hypophysaire tandis que le SRIH hypothalamique l'inhibe. La GH a une action directe sur la croissance et le métabolisme par l'intermédiaire de son récepteur. La GH stimule également la sécrétion d'IGF-1, d'ALS et d'IGFBP-3 majoritairement au niveau hépatique. Il existe une boucle de rétrocontrôle négative de la GH et de l'IGF-1 au niveau hypothalamique et hypophysaire.

Abréviations : ALS : sous unité d'acide labile ; GH : hormone de croissance ; GHBP : GH *binding protein* ; GH-R : GH récepteur ; GHRH : somatolibérine ; IGF-1 : *insulin like growth factor 1* ; IGF-1R : récepteur de type 1 aux IGFs ; IGFBP-3 : *IGF binding protein 3* ; SRIH : somatostatine.

D'après Kappeler, L *et al*, 2006.

cela, des courbes de croissances staturo-pondérales ont été établies (pour les filles et les garçons) afin de vérifier que l'enfant grandit normalement. Ces courbes représentent des couloirs délimités par des lignes supérieures et inférieures qui incluent 95% de la population. De plus, elles permettent de mettre en évidence certains troubles de la croissance en cas de changement de couloirs par exemple.

1. Régulations endocriniennes de la croissance post-natale

a) *Hormone de croissance hypophysaire (GH-N)*

En période post-natale, la croissance de l'organisme passe sous le contrôle de l'hormone de croissance (GH-N). La GH-N est sécrétée par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse et sa sécrétion est elle-même sous contrôle de deux neuropeptides hypothalamiques : le GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone* ou somatolibérine) activateur et le SRIH (*Somatotropin Release Inhibiting Hormone* ou somatostatine) inhibiteur. La GH est sécrétée de manière pulsatile, avec un dimorphisme sexuel. En effet, chez les mâles, la sécrétion de GH présente une pulsativité associée à des pics de hautes amplitudes à intervalles réguliers et séparés par de très faibles concentrations alors que les femelles présentent des pics plus fréquents et irréguliers de moindre amplitude et une concentration basale de GH plus élevée. Cette pulsativité est notamment régulée par les sécrétions de GHRH et SRIH (Farhy *et al.* 2002). Environ 50% de la GH sécrétée circule à l'état libre, le reste étant principalement lié à la GHBP (*Growth Hormone Binding Protein*) qui permet de favoriser le transport de la GH. Cependant, elle présente une affinité moins grande pour la GH que le GHR ce qui favorise l'interaction de la GH avec son récepteur (Rosenbloom 2007). La GH active son récepteur GHR (*Growth Hormone Receptor*) et stimule notamment la sécrétion d'IGF1 hépatique, qui devient alors la source majoritaire de l'IGF1 circulant en période post-natale. La régulation fine de cet axe est assurée par des rétrocontrôles négatifs de la part de la GH et de l'IGF1. En effet, la GH et l'IGF1 ont une action inhibitrice au niveau hypothalamique et hypophysaire. Ces différents éléments constituent l'axe somatotrope (**Figure 9**) (Bluet-Pajot *et al.* 1998).

Concernant le rôle de la GH, elle n'est pas considérée comme un déterminant majeur de la croissance fœtale car l'ablation fœtale de l'hypophyse a peu d'effet sur la taille fœtale. Des études montrent tout de même qu'une déficience congénitale en GH entraîne une taille à la naissance légèrement plus petite (Gluckman *et al.* 1992; Rosenfeld 2003). Cependant, l'impact sur la croissance post-natale est beaucoup plus sévère. En effet, les souris déficientes pour le GHR et la GHBP (modèle murin du syndrome de Laron) présentent un sévère retard de croissance post-natale et une concentration en IGF1 fortement diminuée sans impact sur leur fertilité (Zhou *et al.* 1997). Les souris *lit/lit*, déficientes en GH suite à une mutation du récepteur au GHRH (GHRH-R), ont des taux d'IGF1 réduits et un sévère retard de croissance post-natale. Ceci appuie le rôle essentiel de l'IGF1 stimulé par la GH dans la croissance post-natale. En plus de son rôle sur la croissance du squelette, la GH joue un rôle sur la croissance des tissus dont certains y sont très sensibles comme les reins ou le coeur (Eicher and Beamer 1976; Donahue and Beamer 1993). La GH a également un rôle anabolique et lipolytique. Une étude a notamment mis en évidence qu'un traitement d'adultes atteints d'une sévère déficience en GH par de la GH recombinante humaine, entraîne de grands changements au niveau du métabolisme. En effet, après un traitement de 6 mois, les patients ont une redistribution de la composition corporelle avec une diminution de la masse grasse et une augmentation de la masse maigre. Cela serait dû aux actions anaboliques et lipolytiques de la GH (Salomon *et al.* 1989). De plus, la GH ayant un rôle antagoniste de l'insuline, le traitement à court terme à la GH peut entraîner des altérations de la sensibilité à l'insuline.

Il est à noter que certains effets anaboliques de la GH semblent aussi pouvoir être indépendants de l'IGF1. Par exemple, il a été montré chez le rat que la masse musculaire des pattes augmentait durant un traitement à la GH recombinante mais pas en cas d'administration d'IGF1 (Guler *et al.* 1988).

Il existe de nombreux facteurs au niveau du système nerveux central ou de la périphérie régulant la sécrétion de GH-N. Outre le GHRH et le SRIH cités ci-dessus, on peut également citer les sécrétagogues de la GH (GHSs) qui réguleraient également la sécrétion de la GH. Par exemple, la ghréline, hormone sécrétée par l'estomac, connue pour son rôle stimulateur de la prise alimentaire, stimulerait également la sécrétion de la GH. En outre, il est à noter que l'insuline, qui est régulée par la nutrition, a un rôle dans la synthèse de l'IGF1 et sa capacité de sécrétion en réponse à la GH. En effet, en cas de dénutrition et de

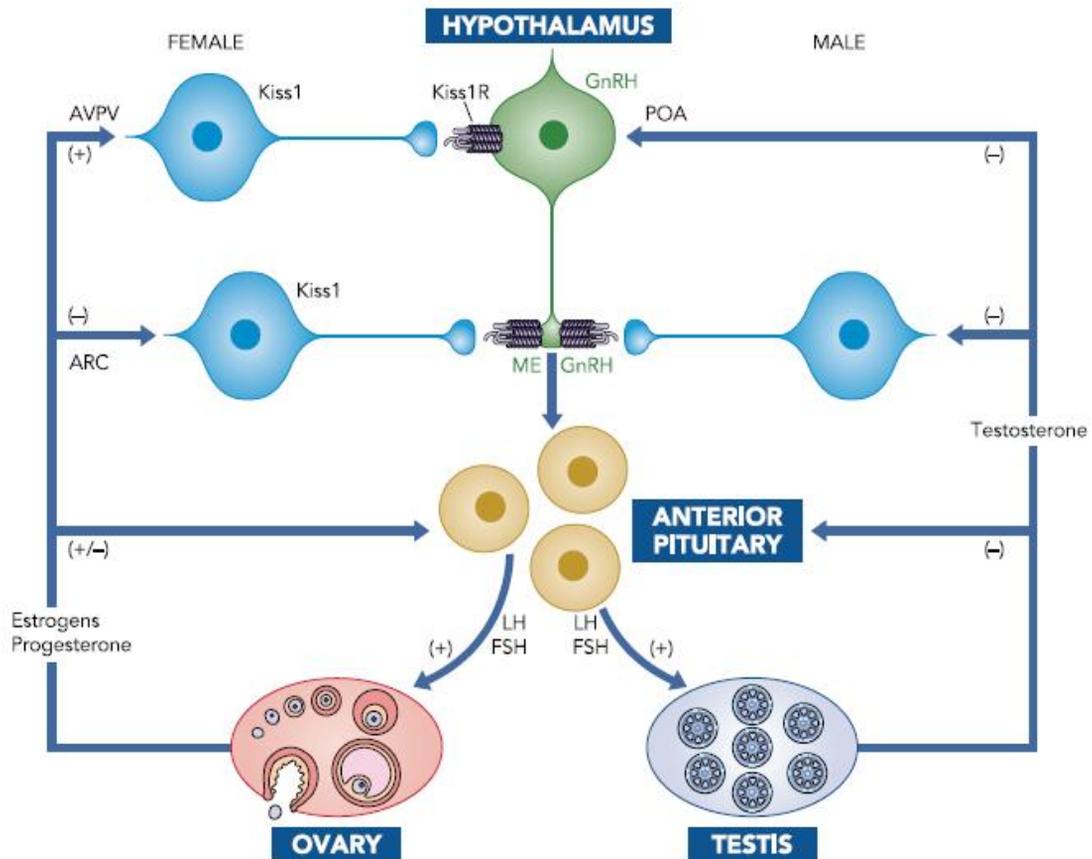


Figure 10 : Représentation schématique de l'axe gonadotrope. Le GnRH hypothalamique stimule la sécrétion hypophysaire des hormones gonadotropes, LH et FSH. Ces dernières vont stimuler la production gonadique des hormones stéroïdes qui vont former une boucle de rétrocontrôle négatif pour réguler la production de GnRH, LH et FSH. Les neurones à Kisspeptine (Kiss1) agissent comme relais de ce rétrocontrôle. Chez les femelles, des niveaux élevés d'œstrogènes et de progestérone stimulent les neurones à kisspeptine de l'AVPV pour induire le pic préovulatoire de GnRH et LH, alors qu'ils inhibent l'expression de KISS1 dans l'ARC. Chez l'homme, la testostérone circulante régule négativement la libération de GnRH et LH, notamment par l'activité des neurones à kisspeptine de l'ARC.

Abréviations : ARC : noyau arqué ; AVPV : noyau périvericulaire antéroventral ; FSH : hormone folliculo-stimulante ; GnRH : *gonadotropin releasing hormone* ; KISS1 : Kisspeptine 1 ; LH : hormone lutéinisante ; ME : éminence médiane ; POA : aire préoptique.

D'après d'Anglemont de Tassigny, L and Colledge, WH, 2010.

diminution de l'insulinémie, le nombre de récepteur hépatique à la GH diminue fortement et la synthèse d'IGF1 hépatique est bloquée au niveau post-transcriptionnel, induisant ainsi une résistance à la GH (Thissen *et al.* 1999).

Des travaux ont été réalisés sur l'utilisation de la GH ou de l'IGF-1 pour tenter d'inverser les effets de la programmation du développement des animaux suite à une restriction nutritionnelle de la mère. Chez des rats adultes nés de mères sous régime hypocalorique (30%), un traitement de 21 jours à l'âge adulte a permis de normaliser la pression artérielle et de diminuer l'adiposité (au niveau des dépôts gonadiques et rétropéritonéaux). Cependant, ces changements ont été accompagnés d'une hyperinsulinémie et d'une hypertrophie cardiaque (Vickers *et al.* 2002). Dans ce même modèle de restriction nutritionnelle, un traitement de 14 jours par l'IGF-1 permet d'atténuer les phénotypes observés avec une diminution de la tension artérielle, de la masse grasse, de l'insulinémie, de la leptine et de l'appétit (Vickers *et al.* 2001).

Chez les rongeurs, l'axe somatotrope se forme à partir de la dernière semaine de gestation (E_{16,5}) et durant les deux premières semaines de vie, durant la lactation. Durant cette période, les axones des neurones à GHRH, localisés dans l'ARC, innervent l'éminence médiane où ils vont sécréter le GHRH au niveau du système porte. Durant cette période, le GHRH stimule la prolifération et la différenciation des progéniteurs hypophysaires qui donneront les cellules somatotropes, sécrétant la GH. La GH-N est sécrétée précocement mais ne stimule la synthèse et la sécrétion d'IGF1 hépatique qu'à partir de 20 jours de vie (chez le rongeur), âge à partir duquel le foie exprime le récepteur à la GH. Avant cet âge, la croissance staturale est encore GH-indépendante. L'impact de la nutrition périnatale sur cet axe sera abordée ci-dessous (cf 2. Régulations nutritionnelles de la croissance post-natale, page 43).

b) Hormones sexuelles

Les hormones sexuelles (testostérone, œstrogènes et progestérone) ont une action primordiale lors de la 3^{ème} phase de croissance, la croissance pubertaire. Les hormones sexuelles font partie de l'axe neuroendocrinien hypothalamo-hypophyso-gonadique ou axe gonadotrope (**Figure 10**). Cet axe intervient dans le déclenchement de la puberté et la

régulation de la reproduction. Cet axe est essentiel pour la maturation des organes sexuels, les sécrétions de stéroïdes sexuels et de nombreux facteurs ou hormones (hormone anti-müllérienne, AMH ; inhibine...) et pour la gamétogenèse (spermatogenèse chez le mâle et oogenèse chez la femelle) (d'Anglemont de Tassigny and Colledge 2010; Caron *et al.* 2012).

Au niveau de l'hypothalamus, les neurones à gonadotrophine (GnRH, *gonadotropin releasing hormone*) stimulent la sécrétion des hormones lutéinisante (LH, *luteinizing hormone*) et folliculo-stimulante (FSH, *follicle stimulating hormone*) par les cellules gonadotropes antéhypophysaires. La LH et la FSH agissent sur les gonades (ovaires ou testicules) pour permettre la sécrétion des stéroïdes sexuels, œstrogènes et androgènes. On distingue également au niveau de l'hypothalamus la présence de neurones à kisspeptine qui permettent de réguler la sécrétion de GnRH. Les stéroïdes sexuels forment une boucle de rétrocontrôle sur les neurones kisspeptinergiques, activatrice ou inhibitrice, ce qui permet aux gonades de réguler l'expression de GnRH. Ainsi, la testostérone inhibe les neurones à GnRH et les neurones kisspeptinergiques localisés dans l'ARC. Les œstrogènes vont quant à eux stimuler les neurones à kisspeptine localisés dans le noyau antéro-ventral périventriculaire de l'hypothalamus (AVPV) et inhiber ceux localisés dans l'ARC (d'Anglemont de Tassigny and Colledge 2010).

Concernant leurs effets sur la croissance staturale, les hormones sexuelles agissent au niveau hypothalamique sur les neurones à GHRH et SRIH afin de réguler la sécrétion de la GH (Chowen *et al.* 2004). L'augmentation de ces hormones au démarrage de la puberté permet de déclencher le pic de croissance pubertaire. Néanmoins, cette action accroît également la vitesse de l'ossification des cartilages de croissance. Ainsi une puberté trop précoce pourrait entraîner une soudure prématurée des cartilages de croissance et donc un arrêt rapide de la croissance, avec au final un risque de petite taille.

2. Régulations nutritionnelles de la croissance post-natale

Durant la période post-natal précoce, l'organisme toujours en développement a des besoins importants en nutriments. Durant cette période, la croissance est GH-indépendante

et dépend de facteurs sériques tels que l'IGF1, qui sont très sensibles à la nutrition. La quantité d'énergie dont l'enfant a besoin varie selon son âge et sa taille. Ainsi toute altération de la nutrition à cette période peut affecter la croissance de manière irréversible que ce soit de manière directe sur les organes ou *via* une atteinte au niveau de l'axe somatotrope.

En effet, une étude précédente du laboratoire a étudié chez la souris l'impact d'un changement de nutrition durant la période de lactation, en modifiant les tailles de portées, sur la croissance post-natale. Les portées ajustées à 3 petits par mère durant leur lactation présentaient un gain de poids plus rapide qui perdurait à l'âge adulte, associé à une longueur naso-anale plus grande (*vs.* 6 petits par mère chez la Contrôle). A l'inverse, les souris issues de larges portées (10 petits par mère) présentaient une diminution du poids qui persistait à l'âge adulte, associé à une longueur naso-anale plus petite. Ces altérations étaient accompagnées d'une modification cohérente de la mise en place de l'axe somatotrope : altération transitoire de l'expression de GHRH hypothalamique à 10 jours de vie (diminuée chez les souriceaux restreints et augmentée chez les souriceaux sur-nourris), et une altération permanente des contenus hypophysaires en GH associés à des modifications d'IGF1 et d'ALS plasmatique (Kappeler *et al.* 2009). Une seconde étude du laboratoire s'est plus spécifiquement intéressée sur les mécanismes impliqués dans la mise en place de l'axe somatotrope par la nutrition. Il a été mis en évidence que l'IGF1, synthétisé de manière ubiquitaire en réponse à la nutrition et notamment aux apports en amino-acides, stimulait spécifiquement la croissance des neurones GHRH durant la 1^{ère} semaine de vie. En cas de restriction des souriceaux pendant la période de lactation (grande taille de portée), l'IGF1 était diminué et ne permettait plus la croissance rapide de ces neurones. En outre, il a été mis en évidence une résistance de ces derniers à une stimulation ultérieure par IGF1 (Decourtye *et al.* 2017). Ce mécanisme est important car le GHRH en période post-natale précoce permet la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes qui permettront ultérieurement la synthèse de GH-N. Ceci programme donc le niveau d'activité adulte de l'axe somatotrope, et impact la croissance staturo-pondérale et le métabolisme adulte. Ainsi, ces souris présentent des altérations métaboliques à l'âge adulte. Les souris sur-nourries durant la lactation présentent une intolérance au glucose associée à des taux élevés d'insuline à jeun, et les souris restreintes présentent une hypo-insulinémie avec un

retard d'absorption du glucose. De plus, ces deux groupes présentent une hypertension artérielle avec l'âge.

Ces modifications au niveau du métabolisme ne sont néanmoins pas dues uniquement à des altérations de l'axe somatotrope. En effet, des études ont notamment montré que la période post-natale précoce (période de lactation) était une fenêtre importante pour la programmation de l'appétit chez le rat : une étude a permis de montrer que des rats dont les portées avaient été nivelées à la naissance à 4 petits par mère consommaient beaucoup plus de nourriture après leur sevrage que des rats ayant été plus nombreux (22 rats par mère) durant la lactation. Dans une seconde expérience, les auteurs ont rajouté un groupe contrôle où la portée avait été nivelée à 13 petits par mère. Ils ont aussi pu observer que plus grand était le nombre de petits dans une portée, plus petite était la consommation alimentaire après le sevrage (données à 4/5, 6/7, 8/9 et 10/11 semaines de vie). Et à l'inverse, si le nombre de petits par portée était réduit, les rats consommaient davantage de nourriture en post-sevrage (Oscari and McGarr 1978). Ces données ont été confirmées par un autre laboratoire, où les petites portées (3-4 rats par mère durant la lactation) ont été associées à un gain de poids dès 5 jours de vie qui persiste après le sevrage, une hyperphagie et une tendance à avoir une hyper-insulinémie basale (Plagemann *et al.* 1992). Ces différentes études permettent de confirmer l'importance de la nutrition dans la croissance post-natale et le métabolisme adulte. Ainsi la période post-natale précoce est aussi une fenêtre critique dans le développement de pathologies ultérieures, notamment chez les rongeurs.

Les mécanismes impliqués dans la modulation de la nutrition des souriceaux (ou ratons) lors d'une modification de la nutrition maternelle ou de la taille des portées ne sont pas encore clairement établis. En effet, durant la période post-natale précoce, les nutriments sont transférés de la mère aux souriceaux/ratons *via* le lait maternel. Une modification de la taille des portées pourrait moduler la quantité de lait ingérée par petit, mais aussi modifier sa composition. De même, une altération du régime alimentaire maternel pourrait impacter la quantité et/ou la composition du lait. En 2015, une étude s'est intéressée à l'impact d'une restriction protéique maternelle durant la gestation et la lactation sur la composition du lait à différents stades de la lactation. La restriction protéique maternelle n'a pas altérée la teneur en protéines du lait mais a réduit la concentration de la plupart des acides aminés

libres en fin de lactation dont certains impliqués dans la sécrétion d'insuline ou la néoglucogénèse. D'autre part, la restriction maternelle a aussi été associée à une augmentation de la concentration en matière grasse du lait qui pourrait, avec le maintien de la teneur en protéines du lait, être un mécanisme d'adaptation permettant de préserver l'apport énergétique pour les petits. Enfin, le lait de mère sous restriction protéique contenait en fin de lactation une diminution de la teneur en lactose qui pourrait refléter une diminution de la production de lait chez ces rattes (Martin Agnoux *et al.* 2015). Néanmoins, une autre étude a évalué les effets d'une restriction calorique de 50% en période périnatale (du 14^{ème} jour de gestation à la fin de la lactation) sur la composition du lait maternelle dans un modèle de rat. La dénutrition maternelle a entraîné une diminution de la concentration en lactose au 10^{ème} jour de la lactation associée à une augmentation du ratio d'acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés, et incluant également des modifications des profils lipidiques au sein des acides insaturés eux-mêmes (augmentation des acides gras polyinsaturés par rapport aux mono-insaturés) (Wattez *et al.* 2015).

D'autre part, les conséquences d'une modification des contenus en protéines du lait ont été étudiées dans un modèle de rat. Ce modèle proche du « *pup in the cup* » utilisait des rats, issus de mères nourries sous restriction protéique durant toute la gestation, nourris artificiellement avec des tubes de gastrostomie, afin de leur délivrer un lait dont la composition était contrôlée jusqu'au sevrage. Il a été observé qu'un enrichissement du lait en protéines a un effet positif sur l'expression de certains gènes impliqués dans le développement neural à P12. Cependant, malgré une amélioration du comportement alimentaire (meilleure satiété), les rats recevant un lait enrichi durant la lactation présentaient à l'âge adulte une prise de poids plus importante, que ceux dont le lait n'était pas enrichi, accompagnée d'altérations du métabolisme (Coupe *et al.* 2011). Ainsi la modification de la composition du lait maternel due à une altération de son régime alimentaire pourrait être en partie responsable des futures altérations de la descendance.

3. Rattrapage rapide de la Croissance et impact métabolique

Le rôle important de la nutrition en période post-natale précoce a été également mis en évidence concernant le développement du système nerveux (Hack *et al.* 1991), et les pathologies métaboliques à l'âge adulte. En effet, afin de diminuer les risques de mortalité précoce du nourrisson et de sous-développement cérébral, la majorité des nouveau-nés nés RCIU avec un PAG bénéficie d'une alimentation avec un lait enrichi. Si environ 90% des RCIU rattrapent une croissance normale dans les 6 premiers mois de vie, il a été observé qu'un retour trop rapide à un poids dans les normes était associé à un risque plus important de développer une obésité précoce, avec une altération de la répartition des graisses et un syndrome métabolique plus sévère (Ong *et al.* 2000; Metcalfe and Monaghan 2001). De manière intéressante, il a également été observé que les enfants nés avec un petit poids de naissance et qui présentent des faibles taux d'adiponectine ont des niveaux encore plus diminués en cas de rattrapage rapide de la croissance (Cianfarani *et al.* 2004). Des études ont montré qu'une concentration élevée en adiponectine était associée à un risque réduit de développer un diabète de type 2 (Spranger *et al.* 2003). Une diminution de la concentration en adiponectine chez les enfants suite à un rattrapage rapide de leur croissance pourrait donc être associée à une prédisposition accrue à développer un diabète de type 2 chez ces derniers. Ainsi, une inadéquation entre les apports nutritionnels en période post-natale précoce et ceux pronostiqués en période foetale pourrait renforcer la prédisposition aux pathologies à l'âge adulte.

D'autre part, une étude en Finlande a montré que le taux de mortalité par cardiopathie coronarienne était plus élevé chez les garçons nés avec un PAG et ayant eu un rattrapage rapide de leur croissance en période post-natale. L'association entre prévalence plus élevée de maladie cardio-vasculaire et petit poids de naissance était cohérente avec les précédentes études mais cette association semble renforcée suite à un rattrapage rapide de la croissance (Eriksson *et al.* 1999). Ces données suggèrent que la composante cardio-

vasculaire semble également sensible à la nutrition en période post-natale précoce chez l'Homme.

4. Les « 1000 jours »

D'une manière générale, l'ensemble de ces observations a permis de mettre en évidence les périodes fœtale et post-natale précoce comme extrêmement importantes pour le développement des individus et leur susceptibilité à développer des pathologies adultes. Ceci a permis notamment d'établir la notion des « 1 000 jours » entre le début de la grossesse et les deux ans de l'enfant (Charles *et al.* 2016). En effet, chez l'Homme, la vitesse de croissance de l'organisme est encore très élevée dans les deux premières années de vie après la naissance : la période prénatale et les deux premières années de vie après la naissance sont donc des périodes de susceptibilité importante pour des effets de programmation à long terme. Ainsi, une malnutrition durant cette période aurait un plus grand impact sur la prédisposition de l'enfant à développer des maladies chroniques à l'âge adulte.

D. Impact du dimorphisme sexuel sur l'émergence des pathologies cardio-métaboliques

Les diverses études réalisées sur les phénotypes observés suite à un RCIU ont pour la plupart révélées un fort dimorphisme sexuel notamment sur les modèles animaux. Par exemple, des études ont montré que les rats mâles une fois adultes développaient une hyper-leptinémie et une résistance à l'insuline plus importante que les femelles suite à une restriction nutritionnelle *in utero* uniquement (Zambrano *et al.* 2006), ou une dénutrition protéique durant toute la période périnatale (Sugden and Holness 2002). D'autres études indiquent que, suite un régime hypo-protéique de la mère gestante, le développement musculaire dans la descendance mâle est plus affecté que celui des femelles. De même, les

mâles développeraient une hypercholestérolémie et une hypertrophie cardiaque plus marquées que les femelles. Les auteurs émettent différentes hypothèses pour étayer ces observations : les mâles pourraient avoir des besoins nutritionnels plus grands que les femelles dus à la croissance plus rapide de leurs tissus et ainsi une altération des nutriments dans les périodes critiques pourrait avoir un impact plus marqué. D'autre part, le matériel génétique contenu sur le second chromosome X chez les femelles pourrait avoir une action protectrice (Desai *et al.* 1996; Lucas *et al.* 1996; Manning and Vehaskari 2001). En effet, chez les rongeurs et les humains, le taux de division cellulaire et le développement sont plus rapide dans les embryons XY que dans les embryons XX. Il existe un dimorphisme sexuel dès le stade fœtal et des différences apparaissent avant même la différenciation gonadique et la sécrétion d'hormones (Tarrade *et al.* 2015).

Le(s) mécanisme(s) précis contrôlant ce dimorphisme sexuel dès le stade embryonnaire n'est pas encore bien compris. Néanmoins, ce dimorphisme semble également influencer les altérations épigénétiques induites par un RCIU au niveau fœtal, qui sont plus fortes chez les mâles. En effet, une augmentation de l'expression de la *Glucose 6-Phosphatase* (G6Pc) hépatique a été retrouvée à la naissance dans la descendance mâle seulement dans un modèle porcin de restriction protéique durant toute la période de gestation. Cette augmentation était associée à une hypo-méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du *G6pc*, une diminution de la marque négative H3K9me3 et une augmentation des marques d'activation H3K4me3 et H3Ac chez les mâles uniquement (Jia *et al.* 2012) (cf III. Mécanismes Epigénétiques, page 51).

En outre, il est à noter que le placenta porte la même information génétique et est du même sexe que le fœtus. Ainsi, le sexe de l'embryon peut affecter la taille du fœtus mais également celle du placenta, et peut affecter la capacité du placenta à répondre aux stimuli extérieurs. En ce sens, une équipe a montré qu'une restriction calorique de 50% entre le 10^e et le 19^e jour de gestation chez la souris entraînait une hypométhylation globale de l'ADN placentaire, plus marquée chez les mâles que chez les femelles, ainsi qu'un effet sexe-spécifique concernant les voies qui sont altérées (Chen *et al.* 2013). Ce dimorphisme sexuel basale entre mâles et femelles au niveau placentaire a également été observé au niveau de la méthylation de gènes soumis à empreinte à E_{15.5} ainsi qu'une altération plus forte chez les mâles dans un modèle impliquant, au contraire, une alimentation riche en graisse (Gallou-

Kabani *et al.* 2010; Gabory *et al.* 2012). D'autres équipes ont à l'inverse montré une sensibilité accrue chez les fœtus femelles, avec une sensibilité du placenta à la nutrition qui inclurait des fenêtres très précoces. En effet, une alimentation de souris avec un régime pauvre en graisses (10% de graisses vs. 26% chez le contrôle) durant 30 semaines avant leur reproduction serait associée avec davantage de gènes dérégulés dans les placentas des fœtus femelles que chez les mâles à E_{12.5}. Les auteurs ont suggéré que ces modifications pouvait indiquer une meilleure adaptation du placenta chez les femelles, afin de temporiser les fluctuations de l'environnement maternelle et de protéger les fœtus (femelles). Cette meilleure adaptation placentaire pourrait expliquer la diminution des risques de développer des pathologies chez les femelles à l'âge adulte (Mao *et al.* 2010).

II. Mécanismes Epigénétiques

A. Généralités

Le terme « épigénétique » a été initialement introduit en 1942 par l'embryologiste Conrad Waddington qui le définissait comme l'interaction complexe entre l'environnement et le génotype conduisant à la production d'un phénotype (réimprimé dans (Waddington 2012)).

L'épigénétique correspond aux mécanismes permettant des changements dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN, réversibles, et transmissibles lors des divisions cellulaires. De manière intéressante, certaines études indiquent également que des marques épigénétiques pourraient être transmises à la descendance (transmission intergénérationnelle)(Jirtle and Skinner 2007). Ces modifications permettent de réguler l'expression des gènes et la fonction cellulaire et peuvent être sensibles à divers facteurs environnementaux. Celles-ci peuvent avoir lieu au niveau de l'ADN et au niveau des protéines histones autour desquelles s'enroule la chromatine. Les modifications de l'ADN comprennent une méthylation de ce dernier et celles des histones comprennent des modifications post-traductionnelles qui peuvent être de différentes natures (méthylation, acétylation, etc). Enfin, il existe également une régulation au niveau des ARNs qui implique des ARN non codants (ARNnc), comme les microARNs. Il est maintenant admis que des anomalies épigénétiques contribuent au développement et à la progression de maladies humaines et de nombreuses études portent aujourd'hui sur l'implication de l'épigénétique dans le développement de pathologie, surtout dans le domaine du DOHaD.

B. La Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone en position 5 d'une cytosine lorsqu'elle est suivie d'une guanine. Cette séquence de di-

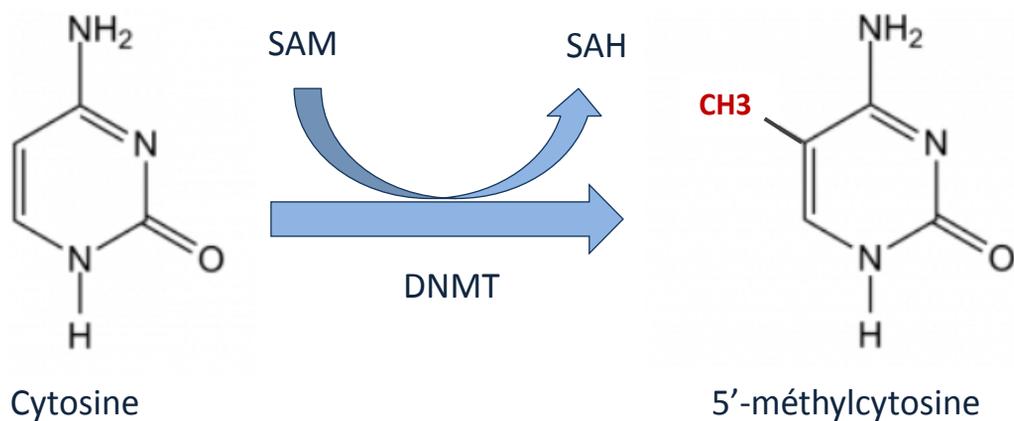


Figure 11: Schéma de la réaction de méthylation de l'ADN sur le carbone 5 d'un résidu cytosine. Les méthyltransférases de l'ADN (DNMT) catalysent le transfert d'un méthyle du cofacteur S-adenosylméthionine (SAM) sur le carbone 5 d'un résidu cytosine. Il se forme un 5-méthylcytosine et la libération de la S-adenosylhomocystéine (SAH).
D'après Cheng, X and Blumenthal, RM, 2008.

nucléotides cytosine-guanine est moins fréquente que les autres combinaisons dans le génome, et est très souvent réunie en îlots (îlots CpG) (**Figure 11**). La méthylation de l'ADN au niveau de ces îlots est associée à une diminution de la transcription génique. Les profils de méthylation de l'ADN sont établis et maintenus grâce à des méthyltransférases de l'ADN (DNMTs) et il a été montré que l'environnement pouvait avoir un impact sur certains profils de méthylation. Chez les mammifères, trois classes de DNMTs ayant des fonctions différentes ont été caractérisées. La DNMT1 intervient surtout dans la maintenance de la méthylation. Cependant cette méthyltransférase assisterait la famille des DNMT3. Cette famille de méthyltransférases *de novo* permet d'établir les profils initiaux de méthylation lors du développement embryonnaire et comprend trois membres : DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L. La DNMT3L est une protéine enzymatiquement inactive car elle est dépourvue de son motif catalytique. Cependant, elle a un rôle positif sur la stimulation de l'activité enzymatique des deux autres DNMT3 et est notamment nécessaire à DNMT3a lors de l'établissement des profils de méthylation. La DNMT3a a été associée à certains processus de différenciation cellulaire (Challen *et al.* 2011). La DNMT3b a été impliquée dans la méthylation *de novo* de l'ADN, et sa perte a été associée à l'instabilité chromosomique et l'immortalisation cellulaire (Dodge *et al.* 2005). Les DNMT3a et 3b pourraient avoir une action complémentaire dans la régulation de la différenciation cellulaire (Challen *et al.* 2014). Enfin, la DNMT2 possède une homologie structurelle avec des autres DNMTs mais elle présente une activité de méthylation des ARNt (Okano *et al.* 1999; Cheng and Blumenthal 2008; Kappeler and Meaney 2010).

La réaction de méthylation utilise comme substrats des donneurs de méthyles qui sont directement apportés par l'alimentation (ex : méthionine et acide folique). Ainsi un apport altéré de ces donneurs de méthyles pourraient donc influencer les profils de méthylation de l'ADN et contribuer à la susceptibilité aux pathologies chroniques à l'âge adulte en engendrant des altérations fonctionnelles (Waterland and Jirtle 2004). En ce sens, une étude sur des rats suralimentés durant la lactation (par réduction de la taille des portées à 3 petits par mère) qui ont développé par la suite une dérégulation de la balance énergétique, avec le développement d'une obésité associée à une hyper-leptinémie et une hyper-insulinémie, a permis d'impliquer une altération des profils de méthylation de l'ADN dans le promoteur de *Pomc* au niveau hypothalamique. En effet, le promoteur de *Pomc*

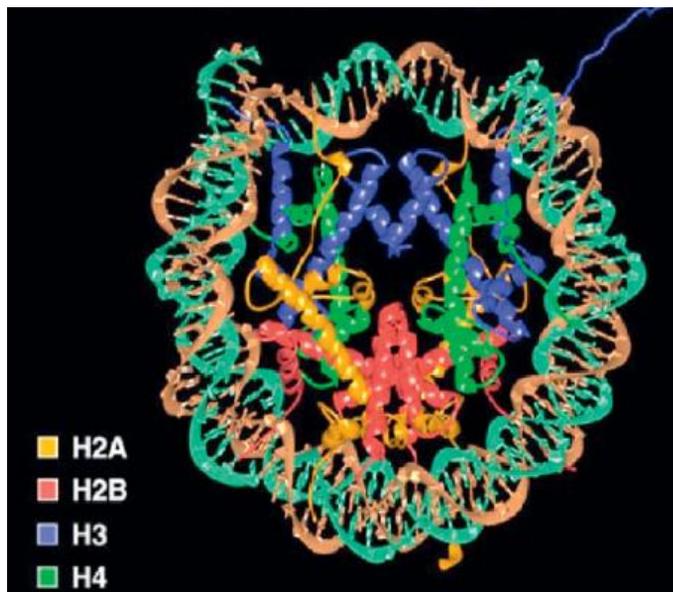


Figure 12: Représentation de la configuration histone-ADN du nucléosome. Le nucléosome comprend 147 paires de bases d'ADN (en marron et vert) enroulés autour d'un octamère de protéines histones H2A, H2B, H3 et H4. D'après Luger, K *et al*, 1997.

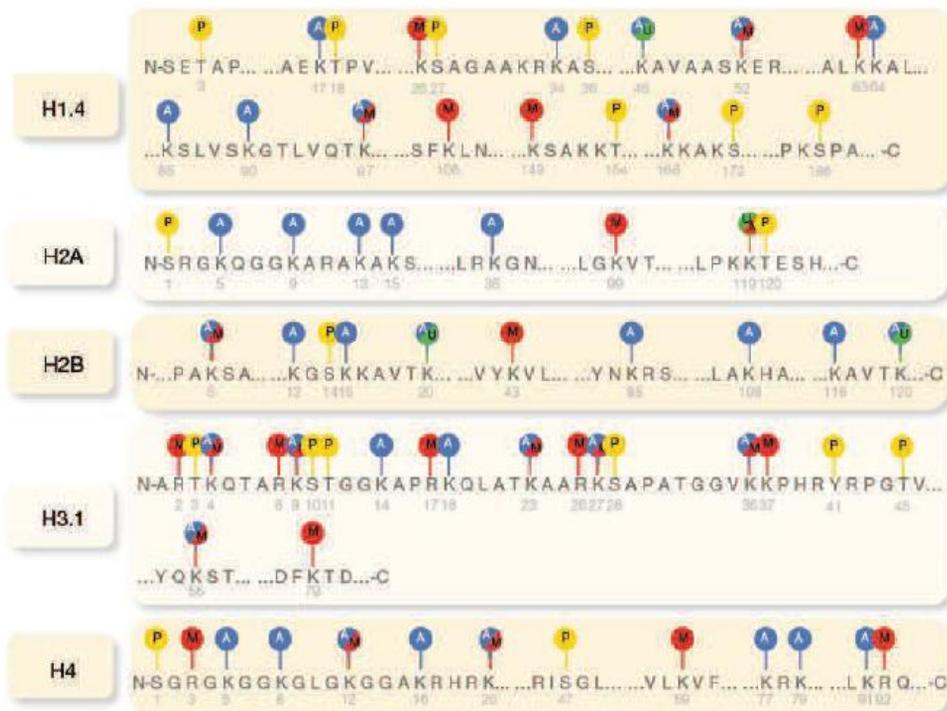


Figure 13: Représentation des principales modifications post-traductionnelles des histones. Les modifications post-traductionnelles présentées sont l'acétylation (bleu), la méthylation (rouge), la phosphorylation (jaune) et l'ubiquitination (vert). En gris est indiqué la position de l'acide aminé. D'après Portela, A and Esteller, K, 2010.

présentait une hyper-méthylation d'îlots CpG, notamment au niveau du site de liaison de deux facteurs de transcription activateurs (Sp1 et NF-κB). Cette hyper-méthylation est associée à une diminution de l'expression de POMC, ce qui diminuerait les effets de la leptine et de l'insuline sur ces neurones anorexigènes (Plagemann *et al.* 2009). Des études successives ont permis d'associer la méthylation du promoteur du gène de *Pomc* à la période post-natale précoce (Coupe *et al.* 2010; Plagemann *et al.* 2010).

C. Les modifications post-traductionnelles des histones

L'ADN, dans les cellules eucaryotes, est organisé sous forme de chromatine dont l'unité fondamentale est le nucléosome. En plus de l'ADN, la chromatine est formée de protéines de deux types : les histones, participant à l'organisation structurale de la chromatine et les protéines non histones (telles que la cohésine et la condensine), influençant la conformation de la chromatine. Il y a 5 types d'histones : H1, H2A, H2B, H3 et H4. Le nucléosome comprend 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère de protéines histones composé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (**Figure 12**). L'histone H1 permet la fixation et le maintien de l'ADN (Luger *et al.* 1997; Luger and Hansen 2005). Les histones sont soumises à différentes modifications post-traductionnelles au niveau des résidus de leur queue N-terminal telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation (**Figure 13**). La phosphorylation se produit sur un résidu sérine (S) ou tyrosine (T), l'ubiquitinylation et l'acétylation sur un résidu lysine (K). La méthylation se produit sur un résidu lysine ou arginine (R) et peut être de différentes formes : mono-(1), di-(2) ou tri-(3) méthylé sur la lysine et mono- ou di-méthylé sur le résidu arginine. Ces modifications sont, pour la plupart, dynamiques et sont catalysées par différentes enzymes telles que les histones méthyltransférases (HMTs) et les histones acétyltransférases (HATs). Elles peuvent affecter la structure de la chromatine en modifiant l'interaction des histones avec l'ADN et moduler l'expression de gènes en influençant directement l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription. Le type de modification ainsi que le résidu concerné, et le nombre de groupements ajoutés

<u>Nature et Période du stress</u>	<u>Espèce</u>	<u>Changements épigénétiques</u>	<u>Organe affecté</u>	<u>Référence</u>
Restriction protéique (8% vs 20%) Gestation	Rat	Hypométhylation de <i>PPARγ</i> et <i>GR</i> Augmentation de l'ARNm <i>PPARγ</i> et <i>GR</i>	Foie	Lillycrop 2005
Restriction protéique (9% vs 18%) Gestation	Souris	E19,5: Hyperméthylation de <i>LXRα</i> Diminution de l'ARNm <i>LXRα</i>	Foie	Van Straten 2010
Restriction protéique (8% vs 20%) Gestation et Lactation	Rat	Hypoacétylation d'H3K9 et H3K14 et augmentation H3K9me3 de <i>Cyp7a1</i> Diminution protéique de <i>CYP7A1</i> Diminution de l'ARNm <i>Jmjd2a</i> foetal Augmentation du cholestérol plasmatique	Foie	Sohi 2011
Restriction calorique de 50% Moitié de Gestation (E11) et Lactation	Rat	<i>Glut4</i> : Hypoacétylation d'H3K14 et augmentation d'H3K9me2 et augmentation d'HDAC1, HDAC4 et SUV39H1 Diminution protéique de GLUT4	Muscle squelettique	Raychaudhuri 2008
Restriction protéique (9% vs 18%) Gestation	Rat	Hyperacétylation d'H3 et H4 de <i>CEBPβ</i> Augmentation de l'ARNm et de la protéine <i>CEBPβ</i>	Muscle squelettique	Zheng 2011
Restriction protéique (8% vs 20%) Gestation et Lactation	Rat	Région <i>enhancer</i> d' <i>Hnf4</i> : Hypoacétylation d'H3, diminution de H3K4me1, augmentation de H3K9me2 Hyperméthylation de <i>Hnf4</i> Diminution de l'ARNm <i>Hnf4</i>	Pancréas	Sandovici 2011
Restriction protéique (10% vs 22%) Gestation et Lactation	Souris	Hypométhylation de <i>Leptine</i> Diminution de l'ARNm <i>Leptine</i> à jeun et de la leptine plasmatique Suite à un repas: ARNm <i>Leptine</i> similaire à celui des contrôles	Tissu Adipeux Blanc	Jousse 2011
Réduction du nombre de petits par mère pour induire une surnutrition Lactation	Rat	J21: Hyperméthylation de <i>Pomc</i> Pas d'altération de l'ARNm <i>Pomc</i> Corrélation inverse entre la méthylation et l'expression de <i>Pomc</i> par unité de leptine ou d'insuline	Hypothalamus	Plagemann 2009
Restriction protéique (8 vs 20%) Gestation et/ou lactation	Rat	Restriction durant la gestation et la lactation: à E12, Hypométhylation de <i>Pomc</i> et diminution de l'ARNm <i>Pomc</i> Restriction durant la gestation suivie d'un régime standard: à E12, Tendance à une hyperméthylation de <i>Pomc</i> et augmentation ARNm <i>Pomc</i>	Hypothalamus	Coupe 2010

Tableau 3 : Modifications épigénétiques au niveau de gènes associés à des pathologies métaboliques dans la descendance de mère soumise à une restriction alimentaire.

Abréviations : E : jour embryonnaire ; J : jour post natal.

Adapté de Seki, Y *et al*, 2012.

pour la méthylation peuvent mener à une activation ou une répression de l'expression des gènes (Kouzarides 2007; Portela and Esteller 2010; Bannister and Kouzarides 2011). Ainsi, l'acétylation des lysines, comme l'acétylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9ac), est associée positivement à l'expression des gènes. A l'inverse, la di-/tri-méthylation de ce même résidu H3K9 (H3K9me2 ou H3K9me3) est associée à une répression de la transcription du gène (Wang *et al.* 2008). Néanmoins, la méthylation des lysines n'est pas toujours associée à une répression de la transcription. En effet, la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est au contraire associée à une activation de la transcription. Ainsi, la variété des types de modifications combinés aux résidus ciblés offrirait un panel très large d'effets sur la transcription génique.

De multiples combinaisons sont de plus possibles, d'autant que certaines modifications ont des localisations préférentielles par rapport au corps du gène. En outre, certaines de ces combinaisons pourraient avoir des effets synergiques ou antagonistes. En effet, la di-méthylation asymétrique de l'arginine 2 de l'histone 3 (H3R2me2) inhiberait l'effet attractif de la marque H3K4me3 pour les facteurs de transcription, et à l'inverse les marques H3K9ac et H3K14ac (acétylation de la lysine 14 de l'histone 3) potentialiseraient celui-ci (Vermeulen *et al.* 2007). Enfin, il est à noter que ces modifications post-traductionnelles des histones seraient complémentaires des modifications épigénétiques au niveau de l'ADN. En effet, il existerait un dialogue entre les marques des histones et la méthylation de l'ADN. En 2005, Fuks a proposé l'hypothèse selon laquelle la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me) permettrait le recrutement d'ADN méthyltransférases (DNMT3a et DNMT3b) qui catalyseraient la méthylation des îlots CpG dans la région la lysine 9 (Fuks 2005). A l'inverse, il a été suggéré que la méthylation de l'ADN attirerait la protéine de liaison MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*) qui elle-même attirerait des enzymes modifiant les résidus d'histones comme les histones désacétylases (HDAC) (Haumaitre 2013).

De nombreux modèles d'altération de l'environnement *in utero* ont été utilisés afin d'étudier le rôle des modifications épigénétiques dans le développement de pathologies métaboliques (**Tableau 3**). Il a par exemple été montré dans un modèle de rats sous régime hypo-protéique qu'une diminution de l'acétylation d'H3K9 et H3K14 et une augmentation de la marque répressive H3K9me3 étaient associées à une diminution de l'expression de *Cyp7α1* (cholestérol 7-α hydroxylase) hépatique, enzyme intervenant dans la transformation

du cholestérol en acides biliaires et une augmentation des niveaux de cholestérol (Sohi *et al.* 2011). Dans un modèle de restriction calorique chez le rat, il a été observé dans le muscle squelettique, au niveau du promoteur de *Glut4*, une hypo-acétylation d'H3K14 associée à un recrutement accru de HDAC1 et HDAC4 et une augmentation de la marque H3K9me2, associée une activité accrue de l'histone H3K9 méthyltransférase 1 (SUV31H1). Ces altérations épigénétiques dans le promoteur de *Glut4* ont été associées à une diminution de son expression génique et protéique (Raychaudhuri *et al.* 2008). D'autre part, il a également pu être mis en évidence dans un modèle murin de RCIU induit par ligature des artères utérines, une diminution du facteur de transcription PDX-1 associée à une cascade de modifications épigénétiques. En effet, une diminution de l'acétylation des histones H3 et H4 (H3ac et H4ac) a été observée dans le promoteur de *Pdx1*, qui s'accroît avec l'âge (à 2 semaines et 6 mois). Celle-ci est associée à une diminution prononcée de la marque stimulatrice H3K4me3 et à l'inverse, à une augmentation de la marque H3K9me2, impliquée dans la condensation et l'inactivation de la chromatine. Cette augmentation est associée à une présence plus importante de la méthyltransférase DNMT3a au niveau du promoteur de *Pdx-1*. Cette dernière initierait la méthylation *de novo* de l'ADN et renforcerait ainsi la diminution d'expression de PDX-1. Ainsi, ces différents mécanismes épigénétiques sembleraient s'associer pour inhiber l'expression de *Pdx1*, et contribuer à l'altération du développement du pancréas observée suite à un RCIU (Park *et al.* 2008).

Il est difficile d'avoir une image claire des effets de chaque modification post-traductionnelle des histones car seules certaines sont présentées, pour des tissus et des modèles particuliers. Néanmoins, nombre de marques épigénétiques pourraient également être impliquées dans les altérations fonctionnelles observées suite à un RCIU. Ainsi, des modifications significatives de l'H3K4me3, l'H3K27ac et l'H3K27me3 ont été observées pour environ 10 000, 4 400, et 3500 gènes respectivement dans le pancréas de rats nés RCIU (Lien *et al.* 2018)(seul le résumé est publié). L'H3K27me3 par exemple a été étudiée dans le cadre de la différenciation cellulaire dans un modèle restriction alimentaire en période pré-conceptuelle chez la brebis (*GR* hypothalamique) (Begum *et al.* 2013), chez le cochon (*G6Pc* hépatique) (Jia *et al.* 2012), et peu d'éléments sont disponibles chez les rongeurs (Park *et al.* 2008; McKnight *et al.* 2016). Une modification de la présence d'H3K27me3 dans le

promoteur de *Lxra* a été observé dans le foie d'une seconde génération de souris issues de mâles nés RCIU (transmission paternelle) (Martinez *et al.* 2014).

Ainsi, en accord avec l'hypothèse du DOHaD, les marques épigénétiques peuvent constituer un mécanisme fort, reliant les altérations du régime alimentaire de la mère à une prédisposition aux pathologies métaboliques à l'âge adulte. L'implication des modifications post-traductionnelles d'histones ou de la méthylation de l'ADN dans la régulation du métabolisme semble un mécanisme très large puisque celles-ci ont également été observées dans des modèles utilisant à l'inverse des régimes obésogènes chez la mère afin d'induire des pathologies métaboliques chez la descendance. Ainsi, un régime enrichi en graisses chez la mère gestante, qui entraîne une augmentation de l'expression du gène de la leptine, corrélée à une hyper-leptinémie chez la descendance mâle, a été associée à une diminution de la méthylation de l'ADN au niveau de la région promotrice du gène de la leptine. De plus, ceci a été associé à une augmentation de l'acétylation d'H3K27 et une diminution de la triméthylation H3K9 au niveau d'un site *enhancer* de la *leptine*, ce qui est en accord avec une possibilité accrue de transcription (Lecoutre *et al.* 2017). Dans ce même modèle, les auteurs ont aussi montré une diminution de l'expression de *PPAR γ 2*, associée à une hyperméthylation de son promoteur ainsi qu'à une diminution des marques actives H3ac et H3K4me3 (Lecoutre *et al.* 2018).

Durant ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à la marque H3K4me3. Comme indiqué ci-dessus, la marque H3K4me3 est une marque associée à la stimulation de la transcription des gènes, qui est localisée principalement dans les régions promotrices des gènes (Bernstein *et al.* 2005). En effet, la marque H3K4me3 sert de site de liaison au facteur de transcription TFIID (Transcription factor II D), requis pour l'initiation de la transcription par le complexe d'ARN polymérase II. En cas de perte de méthyles au niveau du site H3K4, la liaison de TFIID est réduite, ainsi que la transcription du gène en aval. Cette marque bien décrite, est positivement associée à la transcription des gènes et localisée de manière préférentielle au niveau du promoteur proximal ce qui facilitait les expériences de *ChIP-Sequencing* (ChIP-Seq, *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*).

D. Les ARN non codants

Les ARN non codants sont des transcrits d'ARN qui ne sont pas traduits en protéines mais qui peuvent avoir des fonctions importantes dans la régulation de l'expression d'autres gènes. Les ARNnc comprennent notamment les microARNs (miARNs), les petits ARN nucléolaires (snoARN), les petits ARN interférents (siARN) et les long ARN non codants (lncARN) (Eddy 2001; Mattick and Makunin 2006).

Durant ma thèse, je me suis intéressée seulement aux miARNs et je vais donc me focaliser seulement sur ceux-ci dans cette partie. C'est en 1993 qu'est découvert le premier miARN, *lin-4*, essentiel pour le développement larvaire de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et notamment dès le premier stade larvaire. Le gène *lin-4* code pour deux petits transcrits : *lin-4L* (61 nucléotides) et *lin-4S* (22 nucléotides). Les auteurs ont montré qu'une partie de la séquence de ces transcrits étaient partiellement complémentaires à des séquences contenues dans le 3'UTR (*Untranslated Transcribed Region*) du gène *lin-14* et ont ainsi émis l'hypothèse que *lin-4* régulait négativement la traduction de *lin-14* via une interaction ARN-ARN antisens. Ces résultats ont été confirmés la même année par une seconde équipe qui a précisé que la région 3'UTR de *lin-14* était nécessaire et suffisante pour la régulation de sa traduction par *lin-4* (Lee *et al.* 1993; Wightman *et al.* 1993). Quelques années après, un second miARN de 21 nucléotides, *let-7*, a été découvert. Celui-ci est impliqué dans la transition entre le stade larvaire et le stade adulte en régulant négativement la traduction du gène *lin-41*. De manière très intéressante, des orthologues de *let-7* ont été retrouvés dans différentes espèces dont la souris et l'Homme (Pasquinelli *et al.* 2000). L'année suivante, le clonage a permis d'identifier des dizaines de miARNs chez la drosophile et l'Homme (Lagos-Quintana *et al.* 2001). A l'heure actuelle, plus de 1900 miARNs ont été séquencés dans le génome et ils ont des rôles importants dans de nombreuses fonctions physiologiques (développement, différenciation, prolifération...). De manière cohérente, des dérégulations de l'expression des miARNs ont été observées dans des contextes pathologiques.

Les miARNs peuvent aujourd'hui être des cibles thérapeutiques et il existe des études visant à développer des thérapeutiques ciblant les miARNs. Par exemple, une étude

thérapeutique cible le miR-122, spécifique du foie, en utilisant un anti-miR-122 appelé le miravirsén. Ce dernier est actuellement en essai clinique pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C. En effet, après des études fructueuses chez les animaux, une étude en 2013, chez des patients atteints d'hépatite C chronique, a notamment pu montrer qu'une injection sous-cutanée 5 fois par semaine de miravirsén durant 29 jours entraînait une réduction, dose-dépendante, de l'ARN du virus de l'hépatite C (Janssen *et al.* 2013). Mais d'autres analyses sont toujours en cours du fait des potentiels mécanismes développés par le virus pour se stabiliser malgré la thérapie.

1. Nomenclature et outils bio-informatiques

Une nomenclature a été mise au point selon plusieurs critères (Griffiths-Jones *et al.* 2006) :

- Les miARNs matures sont notés « miR ».
- Un code à 3 lettres est ajouté comme préfixe pour désigner l'organisme d'origine. Par exemple, hsa pour *Homo sapiens* ou mmu pour *Mus musculus*.
- Lorsque le pre-miARN donne lieu à deux miARNs matures, on retrouve différentes annotations :
 - miR-X et miR-X* avec miR-X* étant le miARN mature le moins abondant dans les deux brins.
 - miR-X-5p et miR-X-3p avec 5p représentant le brin 5' de la tige-boucle du pre-miARN et 3p le brin 3'.
- Il existe certaines familles de miARNs matures qui se différencient par quelques bases seulement. Cette différence est indiquée par une lettre en suffixe. Par exemple :
 - miR-19a : AGUUUUGCA**U**AGUUGCACUACA
 - miR-19b : AGUUUUGCAG**G**UUUGCACCAGC
- Lorsqu'un miARN mature est le résultat de la maturation de régions chromosomiques différentes, une distinction est faite par un deuxième suffixe chiffré. Par exemple,
 - le miR-19b-1 provient du chromosome 14
 - le miR-19b-2 du chromosome X

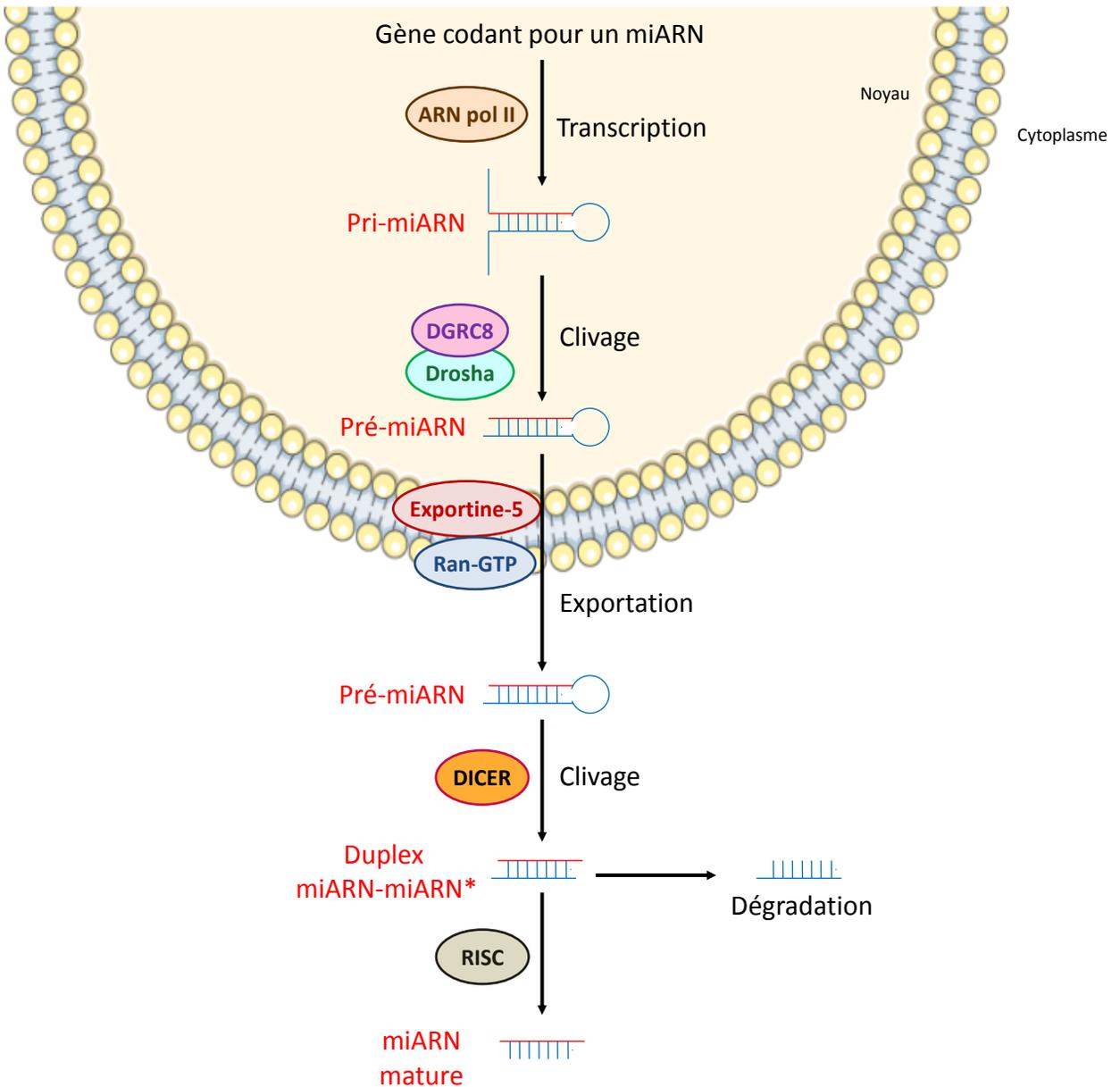


Figure 14 : Schéma de la biogenèse des microARNs. La voie de biogenèse des miARNs commence par la production du pri-miARN par l'ARN polymérase II puis son clivage en pré-miARN par le complexe Drosha/DGRC8. Le pré-miARN est ensuite exporté du noyau par l'exportine-5 complexé avec le RAN-GTP. Dans le cytoplasme, DICER clive le pré-miARN. Le brin mature du miARN est ensuite chargé par le complexe RISC afin d'aller réprimer sa cible. Dans la majorité des cas, le brin miARN* est dégradé. D'après Winter, J *et al*, 2009.

Deux approches complémentaires sont utilisées pour étudier la régulation des ARNm par les miARNs : l'approche gène candidat et l'approche globale par miRNome. L'approche gène candidat est basée sur des analyses *in silico* et doit être validée biologiquement. Elle repose sur des bases de données développées afin de prédire les cibles des miARNs dans les régions 3'UTR des ARNm. De nos jours, il en existe plusieurs telles que DIANAmicroT, TargetScan, miRWalk, miRanda et Pictar. Celles-ci sont basées sur plusieurs critères tels que la complémentarité entre la séquence du *seed site* du miARN (nucléotides 2 et 8 en 5' du miARN) et le 3'UTR du gène cible, la stabilité thermodynamique du duplex, la conservation des sites cibles entre espèces, leurs accessibilités et la multiplicité des sites de liaison des miARNs sur le même 3'UTR cible. Les bases de données utilisent des algorithmes différents et il est donc important de recouper les prédictions de différentes bases. L'approche globale consiste à étudier sans *a priori* l'expression différentielle de miARNs dans différents modèles (Sonneville *et al.* 2015).

2. Synthèse des miARNs

La voie de biogenèse des miARNs comporte plusieurs étapes : la transcription du gène en transcrit primaire (pri-miARN), son clivage en précurseur (pre-miARN), son exportation dans le cytoplasme et son clivage en miARN mature (**Figure 14**). Les gènes des miARNs sont retrouvés chez l'humain dans tous les chromosomes et peuvent être régulés par des facteurs de transcription classiques et des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN ou modifications des histones). Ils peuvent être retrouvés soit dans des unités géniques indépendantes (miARNs intergéniques), soit dans des unités géniques codant pour des ARNm qui peuvent eux même coder ou non pour des protéines (miARNs exoniques ou introniques). De plus, les gènes des miARNs peuvent aussi être regroupés en cluster. Enfin, il existe un dernier groupe de miARNs : les mirtrons, codés par de courts introns, sont générés par épissage et ne nécessitent donc pas de clivage (Winter *et al.* 2009; Kapinas and Delany 2011).

Les gènes des miARNs sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II afin de produire le pri-miARN, constitué de centaines à des milliers de nucléotides. La structure du pri-miARN est constituée d'une tige d'environ 33/35 paires de bases, une boucle terminale

reliant les deux brins de la tige et des segments d'ARN simple brin en 5' et 3'. Ce pri-miARN est ensuite clivé en un précurseur d'environ 65 nucléotides, le pré-miARN, par un complexe protéique appelé microprocesseur. Celui-ci est notamment composé d'une ribonucléase de type III, DROSHA, et d'une protéine de liaison à l'ARN double brin, DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*), qui permet de déterminer le site de clivage précis pour DROSHA. Le pré-miARN est composé de la structure tige-boucle et possède deux nucléotides non appariés à son extrémité 3'. Le pré-miARN est ensuite exporté hors du noyau afin de finir sa maturation dans le cytoplasme. Cet export du noyau vers le cytoplasme se fait grâce à l'exportine-5 qui forme un complexe avec le Ran-GTP. Ce complexe permet au pré-miARN d'être protégé de la dégradation nucléaire par les nucléases (Lund *et al.* 2004). L'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP par la Ran-GAP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et ainsi la libération du pré-miARN. Après la dissociation du complexe dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par DICER, une ribonucléase de type III (Hutvagner *et al.* 2001). Ce clivage génère un duplex miARN-miARN* d'une vingtaine de paires de bases chacun. L'un des deux brins du duplex miARN-miARN* est appelé le brin guide ou miARN mature et l'autre brin, miARN*. DICER se lie au pré-miARN préférentiellement au niveau des deux nucléotides en 3' laissés libres par DROSHA et il interagit avec des cofacteurs protéiques : TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*) et PACT (*protein activator of the interferon-induced protein kinase*). Ces deux cofacteurs ne sont pas essentiels à l'activité catalytique de DICER mais semblent la faciliter. Le duplex miARN est ensuite chargé sur une protéine de la famille des argonautes pour former avec DICER-TRBP le complexe pré-RISC (*RNA-induced silencing complex*). Le complexe RISC est activé par la dissociation du duplex. Le complexe miARN mature-RISC se fixe sur l'ARNm cible du miARN et réprime sa traduction. Le miARN* est généralement dégradé mais peut également avoir une fonction dans la répression de gènes. Le brin guide est déterminé lors de l'étape de chargement, le plus souvent le brin avec une extrémité 5' instable ou le brin dont le premier nucléotide sont choisis ; toutefois la sélection n'est pas stricte (Winter *et al.* 2009; Ha and Kim 2014).

Nature du Fluide	Liquide Amniotique	Lait Maternel	Lavage Bronchique	Liquide Céphalo-rachidien	Colostrum	Liquide Péritonéal	Plasma	Liquide Pleural	Salive	Liquide Séminal	Larmes	Urine
Concentration en (µg/L)	570	47240	1128	111	585	775	308	470	1945	17770	564	94
Nombre de miARN détectés	359	429	260	212	386	397	349	210	458	436	320	204

Tableau 4 : Caractérisation de miARNs présents dans 12 fluides biologiques. La quantité de miARNs a été estimée ainsi que le contenu en miARN. L'identification des miARNs a été faite à partir d'un panel contenant 714 miARNs. D'après Weber, JA *et al*, 2010.

3. Action des miARNs

Environ 60% des gènes humains codant pour une protéine sont régulés par des miARNs (Friedman *et al.* 2009). L'appariement du miARN mature contenu dans le complexe RISC se fait avec une séquence partiellement complémentaire appelée MRE (*miRNA response element*). Cette séquence est généralement située dans le 3'UTR des ARNm mais a aussi été retrouvée au niveau des séquences codantes ou dans le 5'UTR de l'ARNm cible. Le critère le plus important pour prédire la fixation d'un miARN sur sa cible est une complémentarité parfaite entre les nucléotides 2 et 8 en 5' du miARN (le *seed site*) et l'ARNm cible. En effet, cet appariement est suffisant pour réprimer l'ARNm cible. Dans certains cas, un appariement étendu en région 3' du miARN peut compenser un mésappariement au niveau du *seed site* (Lewis *et al.* 2003).

Les miARNs régulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes en inhibant leur traduction ou en dégradant leur ARNm. Cette régulation dépend de la complémentarité du miARN à l'ARNm cible : si la complémentarité des bases est parfaite, le complexe miARN-RISC va dégrader l'ARNm cible ; à l'inverse, si la complémentarité est imparfaite, la traduction de l'ARNm va être inhibée (Filipowicz *et al.* 2008; Kapinas and Delany 2011). Dans de très rare cas, les miARNs ont été associés avec une activation de la traduction. Par exemple, il a été montré que le miR-122 était capable de stimuler la réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C en se fixant à sa partie 5'UTR (Henke *et al.* 2008).

4. miARNs circulants et bio-marqueurs

Les miARNs permettent de contrôler la traduction de leurs cibles et une altération de leur expression a été associée à différentes pathologies. De manière intéressante, il a été montré que les miARNs pouvaient être excrétés ou sécrétés par leurs cellules productrices et se retrouver ainsi dans la circulation sanguine (Chen *et al.* 2008; Mitchell *et al.* 2008). De manière cohérente, les miARNs ont été aussi retrouvés dans les autres fluides corporels en plus ou moins forte quantité (liquide séminal, lait maternel, salive, urine...) (**Tableau 4**) (Kosaka *et al.* 2010). De plus, il a été mis en évidence que la mesure des niveaux d'expression

des miARNs dans le sérum étaient reproductibles chez les individus de la même espèce (Weber *et al.* 2010).

Dans différentes études, il a été montré que les miARNs étaient très stables et résistants à la dégradation. En effet, une étude a montré qu'après une exposition de 3 heures à la RNase A, la majorité des miARNs testés étaient résistants au clivage enzymatique. De même, l'expression des miARNs du sérum n'était pas altérée malgré une exposition à des modifications fortes du pH ou à des cycles de congélation/décongélation (Chen *et al.* 2008). De même, une autre étude a mis en évidence la stabilité des miARNs plasmatiques malgré une incubation du plasma à température ambiante durant 24h (Mitchell *et al.* 2008). Ainsi, ces arguments ont mené les différentes équipes à suggérer les miARNs comme de potentiels bio-marqueurs de diagnostics ou de pronostiques. Dans une étude multicentrique publiée en 2011, les auteurs ont déterminé les profils d'expression de 863 miARNs de 454 échantillons sanguins de patients atteints de différents cancers (prostate, ovaires...) ou de pathologies non cancéreuses (pancréatite, sarcoïdose...) ou d'individus sains par un miRNome. Après validation des résultats par RT-PCR, ils ont observé des profils d'expression des miARNs dérégulés pour toutes les maladies testées : 62 miARNs étaient dérégulés dans au moins six maladies comparés à leur expression chez les individus sains et les analyses moléculaires sur les protéines cibles ont confirmé l'impact des dérégulations des miARNs (Keller *et al.* 2011).

Dans le plasma, la proportion des miARNs circulants non-associés à des structures lipidiques est majoritaire : les miARNs sont seulement complexés aux protéines argonautes. Les miARNs circulants peuvent aussi être sous la forme de quatre types de structures différentes : les exosomes, les microvésicules, les corps apoptotiques et les lipoprotéines (Baulande *et al.* 2014). Il existe une base de données recensant les miARNs circulants appelée miRandola (Russo *et al.* 2012; Russo *et al.* 2018). De manière intéressante, les miARNs circulants sous forme d'exosomes et de vésicules sont probablement des médiateurs pouvant réguler la traduction protéique et la fonction de certains organes à distance.

5. miARNs et restriction nutritionnelle maternelle

Parmi les mécanismes épigénétiques potentiellement impliqués dans le développement de pathologies cardio-métaboliques suite à une restriction alimentaire maternelle, les miARNs pourraient donc aussi être impliqués. Dans une étude sur un modèle murin de restriction protéique durant toute la période de gestation et de lactation, il a été montré que la descendance mâle à l'âge adulte présentait une diminution du poids corporel et de la masse grasse. Au niveau du tissu adipeux blanc, la diminution de l'adiposité était associée à une diminution de la taille des adipocytes. Chez ces animaux, il a été observé une augmentation de l'expression du mmu-miR-483-3p dans le tissu adipeux épидидymaire que ce soit au moment du sevrage ou à l'âge adulte. D'après les bases de données, l'une des cibles du mmu-miR-483-3p serait GDF3 (*Growth differentiation factor-3*) qui est impliqué, *in vitro*, dans la capacité de stockage des lipides dans les adipocytes. En accord avec les résultats, le niveau en ARNm de GDF3 est inchangé entre les deux groupes alors que l'expression protéique est diminuée chez la descendance dont les mères avaient été restreintes. Les auteurs ont aussi pu confirmer ces observations dans des biopsies de tissu adipeux sous-cutané d'hommes nés avec un PAG, ce qui suggère que la modulation de l'expression du hsa-miR-483-3p par la restriction protéique maternelle serait un phénomène conservé (Ferland-McCollough *et al.* 2012).

III. Objectifs

L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier dans un modèle murin l'influence de l'alimentation en période post-natale précoce sur l'émergence des pathologies cardio-métaboliques ainsi que l'implication des mécanismes épigénétiques. En effet, l'association entre induction du RCIU et risque accru de développer des pathologies cardio-métaboliques avec l'âge, qui impliquerait un mécanisme d'adaptation prédictive de l'organisme, est aujourd'hui plutôt bien acceptée : le fœtus modulerait son développement afin d'adapter ses besoins ultérieurs à l'environnement dans lequel il estime qu'il évoluera. En accord avec ce mécanisme, des études ont mis en lumière l'importance de la période post-natale précoce, en montrant notamment qu'en cas de rattrapage rapide de la croissance, l'émergence de ces pathologies pouvait être plus précoce et plus sévère. Le RCIU chez la souris a été induit par une alimentation hypo-protéique/iso-calorique afin de cibler plus particulièrement l'expression de l'IGF1 fœtale, qui est connue pour être très sensible aux acides aminés, et dont la modification suffit à induire un RCIU.

Concernant la modification de la prise alimentaire des souriceaux en période post-natale précoce, la méthode de modification de la taille des portées à la naissance nous a paru la plus adaptée, notamment afin de minimiser le stress chez les souriceaux. Selon cette méthode, le laboratoire avait précédemment montré qu'une altération transitoire de la nutrition chez la souris au cours de la lactation altérait la croissance post-natale, et était associée au développement d'une hypertension artérielle et d'une intolérance au glucose à l'âge adulte (Kappeler *et al.* 2009) sans altération de l'axe corticotrope. Ainsi nous avons décidé de combiner notre étude en modulant l'alimentation en période de lactation afin d'étudier également l'impact du rattrapage plus ou moins rapide de croissance sur notre modèle.

Nous nous sommes également intéressés aux mécanismes sous-jacents, et notamment les mécanismes épigénétiques qui sont de bons candidats. Dans un premier temps, un phénotypage du modèle que nous avons mis en place a été réalisé. Puis un ChIP-Seq a été réalisé au niveau hépatique afin de mettre en évidence l'implication de mécanismes épigénétiques. Cette étude a été plus centrée sur les mâles, plus sensibles que

les femelles au développement de complications métaboliques et a permis de mettre en évidence l'implication de miARNs. Les miARNs étant également retrouvés dans de nombreux fluides, nous nous sommes posés la question de leur potentiel intérêt comme bio-marqueur d'une altération métabolique.

Dans l'attente de mesures au niveau du plasma sanguin dans une cohorte humaine, nous avons profité d'un accès à du plasma séminal (qui contient l'une des plus hautes concentrations en miARNs) de patients infertiles et présentant ou non un syndrome métabolique afin d'étudier le potentiel transfert des bio-marqueurs chez l'Homme.

La reproduction est très liée au métabolisme énergétique. Les femelles nées RCIU dans notre modèle ne présentent pas d'altérations métaboliques de manière spontanée. Néanmoins, des modulations fines pourraient impacter d'autres systèmes comme la fonction de reproduction. Une étude a donc été initiée sur l'impact de la nutrition en période périnatale sur la reproduction des souris RCIU femelles. Les résultats préliminaires obtenus sont présentés en annexe à cette thèse.

RESULTATS

**Etude de l'impact de différents régimes
en période de lactation sur le développement de
pathologies cardio-métaboliques chez
des souris nées avec un RCIU**

Contexte :

Le RCIU touche environ 5% des naissances dans les pays développés. Il est associé à un risque accru de développer des pathologies cardio-métaboliques à l'âge adulte (obésité, diabète de type 2, hypertension artérielle) (Hales and Barker 1992). Les études ont permis d'émettre l'hypothèse d'une origine développementale pour ces pathologies (DOHaD) qui impliquerait un mécanisme d'adaptation prédictive de l'organisme : le fœtus modulerait son développement afin d'adapter ses besoins ultérieurs à l'environnement dans lequel il estime qu'il évoluera. Ainsi, en cas de déviation importante entre l'environnement réel et celui anticipé *in utero*, le risque de développer ces pathologies augmente. Il est ainsi suggéré que l'émergence de ces pathologies peut être plus précoce et sévère en cas de rattrapage rapide de la croissance. A l'inverse, une hypothèse serait que la restriction en période de lactation puisse être un environnement plus adapté pour les nouveaux nés avec un RCIU dans le contexte des pathologies métaboliques (Ong *et al.* 2000; Bateson *et al.* 2004). Les mécanismes impliqués touchent l'organogénèse mais aussi le fonctionnement des tissus. L'altération de ce dernier pourrait impliquer des modifications du statut épigénétique. Néanmoins les mécanismes impliqués sont encore très mal compris.

Objectif :

Le but de ce projet était de mieux comprendre le rôle des modifications épigénétiques dans l'apparition des pathologies cardio-métaboliques suite à un RCIU et l'influence de la nutrition en période post-natale précoce. Ainsi, j'ai étudié l'effet de différentes nutriments appliquées de manière transitoire durant la lactation dans l'induction de pathologies métaboliques adultes chez un modèle murin de RCIU.

Modèle murin :

Pour cela, nous avons mis en place un modèle de souris RCIU induit par un régime hypo-protéique de la femelle gestante. Des souris femelles sauvages (*Wild Type*, WT) 129/SvPas ont été accouplées avec des mâles WT C57BL/6J (Charles River, l'Arbresle, France)

Composition nutritive	A03	R05
protéines	21.4 %	11.8 %
glucides	52 %	61.7 %
lipides	5.1 %	3.1 %
fibres	4.0 %	5.9 %
minéraux cendres	5.4 %	5.5 %
humidité	12.1 %	12 %

Tableau 5 : Compositions nutritives des aliments utilisés pour le protocole d'induction du RCIU. Nous avons utilisé les aliments A03 (Safe) comme régime normal car classiquement utilisé pour la reproduction, et l'aliment R05-10 (Safe) qui est un régime hypo-protéique (-40%).

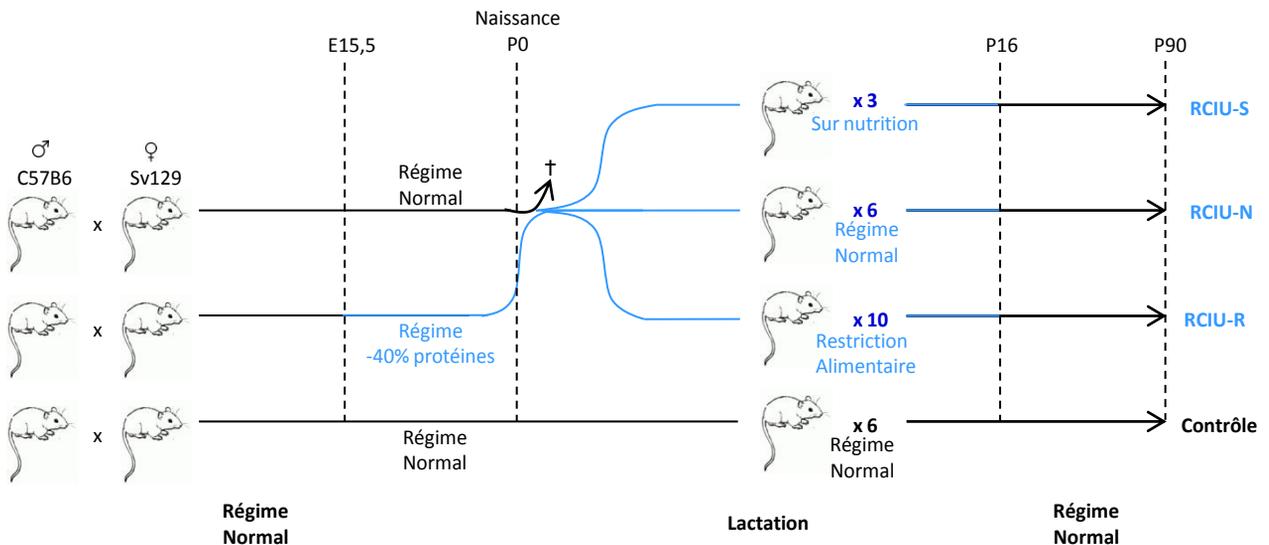


Figure 15: Modèle murin d'induction de RCIU et de modulation de la nutrition durant la lactation.

afin d'obtenir une cohorte expérimentale sur un fond mixte, stable et contrôlé. Ce fond mixte a déjà été utilisé à plusieurs reprises par l'équipe et sa dynamique de croissance est bien connue du laboratoire. Le RCIU a été induit par une alimentation *ad libitum* des femelles gestantes à partir du jour embryonnaire 15,5 (E_{15,5}), isocalorique et réduite de 40% en protéines (R05, Safe) (**Tableau 5**). A la naissance, les souriceaux sont adoptés par une mère receveuse, ayant mis bas le même jour, et ayant reçu une alimentation contrôle (A03, Safe) durant toute la gestation. Ceci permettait de contrôler l'alimentation des souriceaux sans le biais d'une re-nutrition de la mère en parallèle. Les modifications nutritionnelles des nouveau-nés ont été obtenues par un changement de la taille des portées. Ces modifications permettent de modifier l'apport nutritionnel durant la période de lactation (P1-P16) sans séparer les mères des petits, ce qui pourrait induire les effets indésirables d'un stress répété. La taille moyenne d'une portée de souris 129/SvPas dans notre animalerie est de 6 petits. Ainsi, les nouveau-nés RCIU ont été redistribués le jour de leur naissance, et les portées nivelées à 6 petits par mère (groupe normalement nourri, RCIU-N ou *IUGR-N*), à 3 petits par mère (groupe sur-nourri, RCIU-S ou *IUGR-O*) et 10 petits par mère (groupe restreint, RCIU-R ou *IUGR-R*). Ces 3 groupes ont été comparés à un groupe de souris Contrôles, normalement nourries durant la période de gestation et celle de lactation (6 souriceaux par mère après la naissance, Contrôle ou *Control*). Les souris sont nourries normalement après P16 (sevrage naturel) et séparées de leur mère à 28 jours de vie (P28). Durant toute l'expérience, les mères (gestantes et lactantes) et les souris de la cohorte expérimentale ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau, fournies *ad libitum*. Durant la période de lactation, les souris ont reçu l'alimentation contrôle (A03, Safe). Une semaine après le sevrage de la cohorte expérimentale, à l'âge de 28 jours, les souris ont reçu une nourriture de stabulation (Rod16, LASQCdiet) (**Figure 15**).

Fetal Programming of Metabolic Syndrome Involves Early-Onset

Alterations of Epigenetic Marks and microRNA in Mouse

S. Saget¹, R. Cong^{1§}, L. Decourtye^{1§}, M.L. Endale², L. Martinerie³, C. Girardet¹, C. Perret²,
M. Clemessy¹, L. Dinard¹, B. Moumassa⁴, M. Lombes³, B. Feve¹, M. Moldes¹, D. Tregouet²,
Y. Le Bouc¹, L. Kappeler^{1*}

Address:

1 Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche St-Antoine, CRSA, Paris, France,

2 Sorbonne Université, INSERM, Research unit on cardiovascular, metabolic and nutritional diseases, Paris, France,

3 Université Paris Saclay, INSERM, Le Kremlin-Bicêtre, France

4 Sorbonne Université, INSERM, UMS OMICS, Paris, France

Corresponding Author*: Laurent Kappeler, laurent.kappeler@inserm.fr

Running title: Altered histone marks and miRNA19a in adult IUGR mice

Key words: IUGR, nutrition, microRNA19a, Histone, Liver, Insulin, DOHaD.

Financial Disclosure: This study benefited of supports from Inserm (L.K., Y.L.B.), Sorbonne université (L.K., Y.L.B.), IHU ICAN (L.K.), Premup foundation (L.K., Y.L.B.), Fondation pour la recherche médicale FRM (Y.L.B.), Research grant SFD - MSD (L.K.), S.S. benefited of a fellowship from Premup/Sorbonne université and from Sandoz-SFEDP.

Foot note: § authors contributed equally.

Abstract

Obesity and their associated comorbidities like cardio-metabolic pathologies are a worldwide epidemic. This situation may worsen since evidences also suggest that individuals born with intrauterine growth restriction (IUGR) (5-7% of births) are more prone to develop these pathologies, notably if they presented a rapid catch-up growth. A preclinical model was used to induce IUGR and modulate nutrition of pups during the early postnatal period. Early-onset molecular alterations were highlighted in insulin signaling pathway of mice without any clinical phenotype yet. Implication of epigenetics mechanisms were highlighted by ChIP-Sequencing in liver, including histone post-translational modifications and microRNAs. These two mechanisms coherently diminish the expression of Akt and increase the translation of its inhibitor Pten respectively, and may be involved in the insulin resistance that develops later-on. Importantly, one microRNA (miRNA19a-3p) was decreased in blood of adult IUGR mice before they developed clinical phenotype, and may serve as potential predictive biomarker.

Overweight and obesity are a worldwide epidemic. Indeed, 1.9 billion of adults (39% of the world's adult population) were overweight in 2016, with more than 650 million being obese (13% of the world's adult population) ¹. Obesity and overweight are associated with numerous comorbidities as certain type of cancer and cardiometabolic pathologies: arterial hypertension, diabetes and insulin resistance. Cardiovascular diseases account for 17.9 million and diabetes for 1.6 million people annually ¹. This epidemic is worsening as it started to impact children. 340 million children and adolescents aged from 5 to 19 years-old were overweight or obese in 2016. It drops from 4% in 1975 to over 18% in 2016. Children who are overweight or obese are at greater risk of asthma and cognitive impairment in childhood, and of obesity, diabetes, heart disease, some cancers, respiratory disease, mental health, and reproductive disorders later in life ².

These chronic diseases, also named NCDs are of long duration and resulted from a combination of genetic, physiological, environmental and behavioral factors. Among them, environmental modifications during both the fetal and the early postnatal periods were clearly highlighted as crucial for the programming of late onset pathologies, and notably cardio-metabolic ones. Indeed, numerous studies on small for gestational age newborns ³, preclinical models and on Human cohorts like the Netherlands one whose their pregnant mother suffered from strong nutritional restriction at the end the world war II (Dutch Hunger cohort) ⁴ allowed the rise of the developmental origin of health and adult diseases (DOHaD). In agreement with this hypothesis, the fetal environment and particularly its nutritional environment has been associated with a higher susceptibility to develop cardio-metabolic pathologies in adulthood. Alteration of the fetal environment lead to intra-uterine growth retardation (IUGR) of the fetus, and adults born IUGR develop more frequently cardio-metabolic pathologies ⁴. The great majority of IUGR newborns present a catch-up growth during their first years of life ⁵. However, the rapidity by which IUGR newborns performed their catch-up growth has also

been associated with appearance of more severe and earlier pathologies ⁶. As IUGR newborns represent between 5-7% of birth in developed countries, this particular population may worsen the current worldwide epidemic of obesity and metabolic syndrome.

Here we used a preclinical model to induce IUGR and modulate nutrition of pups during the early postnatal period in order to decipher early-onset molecular alterations in liver and blood of these mice once adult before they developed clinical phenotype.

Results & Discussion

Fetal and early-postnatal food modulation alter growth of fetuses

Low protein diet during pregnancy is a model of choice to induce intra-uterine growth retardation (IUGR) of fetuses. Accordingly, IUGR of fetuses was induced by decreasing the protein ratio to 40% in the regimen of pregnant mice during their third and last week of gestation (E_{15.5}) (Supplemental figure S1A). This modification of chow composition effectively decrease by the protein ingested by the pregnant dam without inducing any daily food intake compensation (Supplemental figure S1), or gestation alteration. Indeed, gestation length (IUGR: 19.88 ± 0.04 days *vs* Control: 19.83 ± 0 .05 days) remains similar between hypo-protein/isocaloric chow and normal chow fed dams. Interestingly, naso-anal length and body weight measurements of fetuses at E_{15.5}, E_{17.5} and E_{18.5} reveal that male fetuses present a higher sensibility to maternal nutrition changes, although they share same uterine horns as female ones. Indeed, male fetuses of pregnant dams fed with hypo-protein/isocaloric chow diet present a significant decrease of both naso-anal length and body weight by E_{17.5} while the effect appears only at E_{18.5} in females (Figure 1A).

At birth, IUGR-pups were cross-fostered to dams fed with normal chow diet and that gave birth the same day to avoid uncontrolled bias in pups' nutrition during lactation. Litters were normalized to 3, 6 or 10 pups per lactating dam in order to follow differential effects of overfeeding (IUGR-O), normal feeding (IUGR-N) or restricted feeding (IUGR-R) of pups during their lactating period, respectively. Pups' body weight gain recorded between the 5th and the 90th day of age was then compared with those of cross-fostered pups normally fed during both gestational and lactating periods (Control) (Figure 1B). As expected, IUGR-R of both sexes does not present any catch-up growth during lactation and remain lighter in adulthood as compared with Control mice. In contrast, IUGR-N and IUGR-O mice both present a rapid catch-up growth and normalize their body weight to the Controls by the 5th day of life. Interestingly, by 30 days of life, IUGR-O and IUGR-N males start to gain more weight than Controls. This is associated with an increased body mass index (calculated with the rodents' dedicated Lee formulae) in 3 month-old mice (see Figure 1C). Regarding females, early postnatal diets effect seems more discreet with only IUGR-O gaining weight and increasing their BMI when reaching adult age (Figure 1B, 1C). Body composition indicates coherent variations of organs weight (Supplementary Table 1) with either IUGR induction and/or sex effects. Interaction between IUGR induction and sex was pointed for body, brain, liver and gonadal fat weights. The glomeruli number, which is highly associated with IUGR ⁷, is strongly decreased in all IUGR male mice irrespective of their postnatal regimen as expected, and much less impacted in IUGR female mice (Supplementary Figure S2). All together, these data confirm the role of nutrition during the entire perinatal period on mice growth and clearly indicate that males are more impacted by the nutritional environment than females starting from the fetal period ⁸⁻¹².

Since male mice seem to present a stronger phenotype in response to the IUGR induced by maternal protein restriction during the third week of gestation, they were specifically kept

up to 18 months of age to measure arterial blood pressure. In agreement with the predictive adaptive response¹³⁻¹⁵, IUGR-N and IUGR-O that have faced a richer environment than anticipated both develop spontaneously with age systolic and diastolic arterial hypertension while IUGR-R seem protected (Supplementary Figure S2).

Perinatal food modulation is associated with metabolic alteration in liver

Since the liver was more impacted in IUGR male mice, we then searched for alterations indicating potential metabolic outcomes. IUGR-O presents liver steatosis by 3 months of age as well as IUGR-N, as highlighted with Oil Red O staining (Figure 2A).

Glucose tolerance tests indicate a slight intolerance in 3 month-old IUGR-O male mice, and a non-significant tendency for IUGR-N ones (Figure 2B). Insulin measurement in fasted mice also suggests that silent alterations may occur as fasting insulin levels and HOMA-IR indexes tended to be increased in 3 month-old IUGR-N and IUGR-O male mice (Supplementary Figure S3). Thus, insulin sensitivity tests (ITT) were performed in 3 and 12 month-old mice and indicate that IUGR-R are highly sensitive to insulin as compared to Control at both ages (Figure 2C). In contrast, IUGR-O are already more resistant to insulin by 3 months of age, although Control male mice start to lose some of their insulin sensitivity with aging. IUGR-N male mice present an intermediate phenotype. Indeed, they present similar insulin sensitivity as Control at 3 months of age and being as insulin resistant as IUGR-O by 12 months of age (Figure 2C). Tests performed in females confirmed no spontaneous metabolic alterations. Only IUGR-O female mice start to be slightly more insulin resistant at 12 month of age (Supplementary Figure S4). We therefore pursued, the study of mechanisms associated with the programming of metabolic alterations in adulthood solely in males.

In order to confirm if alterations already occur in young IUGR-N male mice, notably at the liver level that show signs of steatosis, insulin signaling pathway activation was determined in IUGR male mice after an *in vivo* pulse of insulin. In agreement with results described above, we observed a strong decrease of AKT phosphorylation capacity (i.e. the phospho-AKT / total-AKT ratio) in 3 month-old IUGR-N and IUGR-O mice (Figure 2D). The induction of metabolic pathologies following IUGR is in agreement with numerous studies and the DOHaD hypothesis, notably in case of overfeeding during lactation like for the IUGR-O mice. By modulating the nutrition during the lactating period, we were then able to slower metabolic pathologies appearance and highlight molecular alterations that occur at the very beginning of the pathology process. Thus, these data suggest that metabolic diseases programming like insulin resistance and diabetes may be associated with very early molecular alterations that might be highlighted in organisms without any clinical phenotype.

IUGR is associated with epigenetic modifications in the liver of young adult mice

Fetal programming has been strongly associated with late onset metabolic pathologies and to involve in part epigenetic mechanisms^{15,16}. In order to highlight early molecular alterations, we performed a ChIPSequencing on liver of young adult (3 month-old) non-pathologic IUGR-N mice and Controls. We used the H3K4me3 (trimethylated histone H3 on lysine 4) histone mark known to present a well-defined distribution around the proximal promoter and to be strongly associated with gene expression stimulation. Following the bio-informatic pipeline (Supplementary Figure S5), the pair-end sequencing was quality trimmed at 92-93% in Controls (n=6) and 92-94% in IUGR-N (n=5) and the alignment to the reference genome mm9 (UCSC) was about 75-81% and 76-79%, respectively. The global immunoprecipitation strength was about 68% and 2.61% of the genome was enriched for the signal.

From the four differential statistical approaches, Trended_EdgeR and DESq² offer the best ratio of significant sites and low levels of false positive. Significant differential histone peaks (adjusted p-value <0.05) in common on both Trended_EdgeR and DESq² were thus kept for further analyses (Figure 3A). The resulting heatmap indicates that differential binding sites between Controls and IUGR individuals cluster separately (Figure 3B).

After additional sorting of significant differential binding sites regarding their fold changes and reads amounts, we kept 262 genes for further analysis. DAVID analysis (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8) was performed and highlighted genes involved in the regulation of transcription, notably in link with the polymerase II promoters, chromatin modification and protein phosphorylation (Figure 3C top panel). These genes were equivalently distributed in the three cellular compartments (i.e. cytoplasm, nucleus, membrane) (Figure 3C middle panel). Regarding the molecular function, genes coding for protein with transferase activity and nucleotide (DNA/RNA) binding were particularly enriched. Among them, several gene ontologies (GO) terms related with epigenetics (nucleotide binding, poly(A) RNA binding, DNA binding, chromatin binding, histone-lysine N-methyltransferase activity) and signaling pathways (protein kinase activity, kinase activity, protein serin/threonine kinase activity), were highlighted for biological processes (Figure 3C bottom panel).

Interestingly, the *Akt1* gene was highlighted in 8 different gene ontology (GO) terms in molecular function and was associated with the highlight of 12 different *Mapk* genes. The implication of the PI3K-AKT signaling and MAPK pathways, and notably the insulin signaling pathway was confirmed by KEGG pathway analysis (Benjamini $p=0.003$, FDR: 0.112). In view of the role of AKT in the development of insulin resistance in both IUGR-O and IUGR-N with age and early phosphorylation alterations noticed, we decided to confirm molecular alterations of this gene. The H3K4me3 profile around *Akt1* promoter is clearly

decreased in young adult (3 month-old) IUGR-N mice as compared with age-matched Controls (Figure 4A). The decreased Akt1 mRNA levels were confirmed for IUGR-N and similar levels were observed for IUGR-O while IUGR-R and Controls present similar levels (Figure 4B). The significant decreased of AKT in liver of young IUGR-N and IUGR-O ($p < 0.01$) as well as the trends in IUGR-R (NS) were then confirmed at the protein levels (Figure 4C), suggesting that alteration of total AKT levels through epigenetic mechanisms in young IUGR mice without any visible pathologies may be associated with early onset alterations of AKT phosphorylation, which could facilitate the development of insulin resistance observed later on.

Alteration of AKT activation is associated with modification of PTEN levels through miRNA regulation

We were then interested to further our understanding of the early onset molecular alteration of AKT phosphorylation. Interestingly, a decrease of Pten mRNA levels was observed in all three groups of adult IUGRs mice, irrespectively of their postnatal regimen. However, PTEN protein levels were increased along with nutrition during lactating period (Figure 4E). This increase of PTEN, the inhibitor of AKT phosphorylation, may explain a part of the early onset molecular alteration of AKT phosphorylation observed in adult IUGR-N and IUGR-O mice. However, the apparent discrepancy between PTEN mRNA and protein levels suggests the potential implication of microRNAs (miRNAs).

microRNAs are small (20-25 bp) noncoding RNAs that modulate the expression of various proteins via post-transcriptional inhibition. They are synthesized as pri-miRNA from long non-coding RNA and processed into mature miRNA by Drosha, DGCR8 and Dicer^{17,18}. miRNAs are involved in multiple developmental processes as well as in various pathologies. In

agreement with a potential implication of miRNAs in PTEN deregulation in IUGR mice, DAVID analysis of ChIPSeq experiment indicate that *Dicer* was highlighted in 5 different GO terms in molecular functions, together with *Dgcr8* (2 times) and *Ago2* (3 times). In agreement, enrichment of the positive histone mark H3K4me3 was decreased in the proximal promoter of *Dicer* in 3 month-old IUGR-N mice (Figure 5A). The analysis of *Dicer* gene expression in young adult IUGR mice indicates that its mRNA levels are decreased in all three groups of IUGRs, irrespective of their nutritional regimen during lactation (Figure 5B).

Among miRNAs that could regulate translation of *Pten*, two miRNA –namely miRNA19a and miRNA19b- caught our attention. Indeed, these two miRNA are matured along with 3 other from the same pri-miRNA, the *mir17* host gene (*mir17hg*, ENSMUSG00000089726). This pri-miRNA belong to intergenic lincRNA class and is transcribed by classic cellular machinery and regulated as other classic protein-coding genes^{19,20}. Interestingly, the ChIPSeq analysis performed highlighted this *mir17hg* as a gene with differential enrichment of the positive histone mark H3K4me3 (Figure 5C). The decreased expression of the pri-miRNA was confirmed at the mRNA level in 3 month-old IUGR-N and IUGR-O mice by classic RT-qPCR (Figure 5D). Similar results were obtained for the mature miRNA19a-3p level in liver, which tends to decrease in IUGR-N and is significantly decreased in IUGR-O mice (Figure 5E). In agreement with our data, miRNAs 19a/b were first associated with the regulation of PTEN in stem cells reprogramming and miRNA19a was reported to inhibit PTEN in bladder cancer^{21,22}. Recently, miRNA19b was shown to be increased in diet-induced obese males and to induce metabolic alteration in adult mice when microinjected directly in one-cell embryos²³. miRNA 19a action on PTEN was very recently confirmed in hepatocytes and notably in the regulation of gluconeogenesis and glycogen synthesis²⁴⁻²⁶.

Finally, we measured miRNA 19a-3p level in plasma of 3 month-old mice in order to decipher if it could be measured in blood and reflect early-onset molecular alterations. Three month-old IUGR-O male mice presented with decreased circulating levels of mir19a-3p (Figure 5F), indicating that this miRNA can be measured in blood and reflect an on-going pathology. More interestingly, 3 month-old IUGR-N male mice also present with significantly decreased circulating levels of miRNA19a-3p although they were still without any noticeable clinical phenotype. These data suggest that the miRNA19a-3p could potentially be used as potential predictive biomarker.

miRNAs were first used for certain cancers as prognosis markers ²⁷ and in patient stratification regarding the potential benefice for certain adjuvant treatment ²⁸, with some already commercially available. It is now well accepted that miRNAs can be found in all biological fluids despite their uncertain role in these compartments ²⁹, including blood circulation. Circulating miRNAs in biological fluids start to be used as diagnosis biomarkers for a wide range of cardiovascular diseases, type 2 diabetes or cancer regardless to their biological functions ³⁰. Indeed, miRNA are very good biomarkers candidate as they are highly resistant to degradations from many origins and show stable and reproducible levels in serum, consistent among individuals of the same species ^{31,32} In this way, miRNA biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity recently show an enhanced predictivity when combined with clinical variables notably for nonalcoholic steatohepatitis ³³. However, miRNAs were used up to now for diagnosis and stratification of patients, predict evolution of specific pathologies. The programming of cardio-metabolic pathologies in line with the DOHaD hypothesis may offer the opportunity to highlight circulating predictive biomarkers for people at risk to develop pathologies latter on. This will require numerous additional determinations, notably in patient cohorts. Indeed, childhood is a critical period as part of a strategy to promote a healthy life expectancy. In this way, life-course studies suggest that

interventions in early life, when biology is most “plastic”, are likely to have sustained effects on health, particularly because it can influence responses to later lifestyle factors (WHO Geneva 16).

Materiel and Methods

Animal experiments

All animal procedures were performed in accordance with institutional directives for the care of laboratory animals and approved by the French national ethics committee 05 Charles Darwin (Project protocol agreement numbers Ce5/2011/021, 02216.02 and #8393-2017010314035875). The mice used in these studies were housed under standard SOPF conditions in individually ventilated cages at 22 °C with free access to water and a stabulation chow diet (LASQCDiet Rod16, LASvendi, Soest, Germany; see Supplemental Table 2) under a 12 h light/dark cycle, unless otherwise specified.

129S2/SvPas females were mated to C57BL/6J males (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) to produce offspring with F1 hybrid genetic background. F1 hybrids have a reproducible genetic composition and show the so-called hybrid vigor, i.e. absence of most of the phenotypic defects described in inbred strains. We chose C57BL/6 and 129/Sv because they are two of the most commonly used inbred mice worldwide. 129/Sv were also chosen thanks to the excellent and stable maternal behavior of females caring for fostered pups.

One week before mating, mice were acclimated to control chow (A03, Safe Diets, Augy, France; see Supplemental Table 3) provided *ad libitum*. Pregnancy was timed from the observation of a vaginal plug. Pregnant dams were isolated and housed individually at gestational day 15. IUGR was induced by feeding the pregnant dams with a hypo-protein /

isocaloric diet (-40%; A05, Safe Diets, Augy, France; see Supplemental Table 4) during the third week of gestation. Control litters were produced from female fed control chow during the entire gestation. At birth, IUGR pups were cross-fostered to a control female that gave birth the same day. In our facility, 129/SvPas females deliver on average 6 ± 0.1 live newborns respectively (n = 245 litters). IUGR litters were redistributed on day 1 to yield six newborns per dam for normal milk feeding (IUGR-N), three per dam in the overfed group (IUGR-O) or 10 per dam in the dietary restricted group (IUGR-R)^{34,35}. IUGR mice were compared to a Control group of mice normally fed during both fetal and lactating periods. Male and female pups were homogeneously balanced in each litter and individually identified at 5 days of age by toe clipping. At 28 days of age, all animals were randomly weaned at 7 per cage, independently of their nutritional conditions during their fetal and lactating periods. Mice were then maintained on the stabulation chow diet (LASQCDiet Rod16). A schematic representation of the IUGR model is shown in supplemental figure 1A. Four cohorts were produced. One was analyzed *in utero*, one during postnatal development and at 3 months of age, and two were analyzed for physiopathology at three and 12-18 months. Tissues samples were harvested from 3 and 18 months-old mice under deep isoflurane anesthesia. Organs and tissues were weighed and immediately frozen on dry ice for storage at -80 C. For experimentations and statistical analyses, all pups originate from at least three different litters to avoid any maternal bias.

Assessment of food intake and growth

Food intake was measured in individually housed pregnant dam during the third week of gestation. Mice were provided *ad libitum* with pre-weighed food. Remaining amounts of food

were determined at delivery. Once the number of pups was estimated, daily intake was calculated per animal and normalized per pup number.

For body growth measurement, pups body weight was followed from the fifth to 90th days of age. Naso-anal length was measured at 3 months of age under isoflurane anesthesia. The body mass index (BMI) was calculated with the rodents' dedicated formulae also named as Lee index, using the following formula: $[\sqrt[3]{\text{body weight (g)}} / \text{nasoanal length (cm)}] \times 1000$.

Histological determinations

Oil Red O staining was performed on 16 μ m cryostat sections of liver tissue snap frozen on dry ice. Liver sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min before staining using 0.3% dye dissolved in 60% isopropanol for 10 minutes. Hematoxylin counterstaining was performed before mounting. Oil Red O staining was visualized under a 20X objective using an Olympus BX612 microscope and DP71 CCD camera. Quantification was performed by measuring stained area using NIH ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Glomeruli density per mm² was determined in kidney of adult IUGR and Control mice beforehand paraffin embedded sliced at 7 μ m thickness and stained by hematoxylin and eosin coloration. Glomeruli quantity was estimated by multiplying the glomeruli density by the kidney weight.

Hemodynamic determination.

Systolic and diastolic blood pressures were measured by a non-invasive tail cuff method using Coda 6 (Kent Scientific Corp, Torrington, USA). Signals were recorded and analyzed using Kent Scientific software. After one week of adaptation, 10 measurements were averaged for each mouse.

Evaluation of glucose homeostasis.

Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed one week apart on the same animals after 6h fasting. Tail blood was taken at 0, 15, 30, 60 and 120 min after intraperitoneal (ip) injection of either a 2 g/kg body weight of 20% D-glucose solution (ipGTT) or an 1U/kg of human Insulin (Actrapid Penfill; Novo Nordisk, Paris, France) (ITT). Blood glucose concentration was determined from tail vein blood using Accu-Chek Performa glucometer (Roche, Meylan, France) with electronic probes, requiring very low sample volume (1-3 µl).

Mouse ELISA kit was used to measure insulin (Crystal Chem, Downers Grove, IL). During a dedicated experiment with glucose injection in 6h fasted animals, blood was collected from mandibular vein and plasma isolated (centrifugation 15 min, 2000g, 4C) and quickly frozen before measurement. HOMA-IR was calculated using the following formula: Glycemia (mg/dL) * Insulinemia (mUI/L) /405.

For *in vivo* determination of insulin-signaling pathway activation, mice were fasted for 18h before receiving an ip injection of 5U of human insulin (Actrapid Penfill; Novo Nordisk, Paris, France) or saline. Liver were quickly harvested and snap frozen in liquid nitrogen 10 min later and stored at -80°C until further processing.

Western blotting.

Proteins were extracted from livers homogenized in a hypertonic buffer consisting of 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, and 0.1 mM EGTA, containing cocktails of both protease and phosphatase inhibitors (Roche) as previously described³⁶. After 15 min of incubation on ice, 6.3µl of 1% NP-40 per 100 µl buffers was added, the samples vortexed briefly, and centrifuged at 5000 g for 1 min at 4°C. The protein concentration of the resulting supernatant, enriched for the cytosolic fraction, was then determined by nanodrop. For each sample, 20 µg of cytoplasmic proteins were separated on NuPAGE Bis-Tris (4-12%) gels (Life technologies) and transferred to PVDF membranes. The membranes were then incubated with primary antibodies against phospho-AKT ser 473 (p-AKT) and PTEN (#4060, 1:2000, and #9559, 1:1000, respectively, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) using an anti-rabbit HRP-IgG as a secondary antibody (#7074S, 1:20000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) or with HRP-conjugated antibodies against AKT and Actin (#8596S and #12620 respectively, 1:2000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA). The membranes were then revealed with SuperSignal West Pico (Actin) or Femto Chemiluminescent Substrate (37080, 34095, Thermo Scientific) (p-AKT, AKT and PTEN) using a high sensitivity, cooled charge-coupled device (CCD) 6 Mpx camera on a ChemiDoc Touch Imaging System (Biorad). Relative quantification was performed by densitometric analysis using NIH ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Chip-Sequencing

The Library Preparation and CHIP-sequencing was performed by P3S Platform (P3S, Sorbonne Université, Paris, France). Fifty mg of liver were fixed 8 min in 1% paraformaldehyde, and the DNA was fragmented to 100bp by 25 sonication cycles 30" ON/

OFF, high power (Diagenode Bioruptor sonifier). The chromatin immuno-precipitation (ChIP) was performed following the protocols from Dahl & Collas ³⁷, against the active H3K4me3 (histone H3 trimethylated on Lys 4) histone mark and using a specific ChIP-grade antibody (C15410003-50, Diagenode; Liège, BE). Control immunoprecipitation was performed in parallel by performing a ChIP on an aliquot of each tissue sample to determine the background noise, using a normal serum purified Ig G. After DNA retrieval and purification by phenol-chloroform method, ChIPed DNA was prepared for sequencing. DNA-end was repaired to overhang a 3'-dA, then adapters were ligated to the end DNA fragments that included adaptor and barcode sequences for multiplexed sequencing. After PCR amplification, DNA fragments with proper size (100-300bp) were selected and sequenced. Paired-end multiplex sequencing was performed on Illumina HiSeq 2500 platform for 5 IUGR and 6 Controls H3K4me3-ChIPed DNA and 2 IUGR and 2 Control normal-serum-IgG ChIPed-DNA. Around 80 million of 2*50bp raw reads in fastq format for each ChIPseq sample. Sequence data were filtered and trimmed to get good-quality reads firstly. The pre-processed reads were then mapped to the reference genome mm9 (UCSC). The distribution of uniquely mapped reads was analyzed. Meanwhile, reads enrichment region (peak) was scanned from the whole genome with MACS. After peak scanning, the distribution of peak was analyzed with CEAS, and the differential binding sites between Control and IUGR groups were analyzed with DiffBind package from R/Bioconductor. The pipeline of bioinformatics analysis is shown in supplemental figure S5. Differential analysis of ChIP-sequencing data was performed using edgeR, Trended_edgeR, DESeq and DESeq2 approaches. Comparison of these 4 approaches reveals that outputs are only partially overlapping with a large number of peaks found significantly differential in Trended_edgeR and DESeq2 analysis. Differential histone modification sites was considered significant only when adjusted p-value was <0.05 following both Trended_edgeR and DESeq2 analysis. Some

genes were excluded from the analysis when the number of reads was inferior to 100, their location was superior to 4Kbp from the Transcription Start Sites (TSS, in agreement with the H3K4me3 distribution profile) and log2 fold change was between -0.33 and +0.33. Pathway and gene ontology (GO) function analysis were done for the genes that possess the differential binding sites with DAVID.

Measurement of gene expression

Total RNA was isolated from liver samples using the silica membrane method (Nucleospin RNA II; Macherey-Nagel, Hoerd, France) and quantified on nanodrop. A total of 1 µg of RNA was reverse transcribed using random hexamers, RNase inhibitor, and RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas, Waltham, MA, USA). Quantitative real-time PCR was performed in duplicate using SYBR green technology on an Applied Biosystems 7300 PCR system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), yielding 10 ng of cDNA. The primers used were Akt1 (Fwd TACGGCCCTCAAGTACTCATTCCA, Rv ACACAATCTCCGCACCATAGAAGC), Dicer1 (Fwd GACAGTGTACGGTTGGCTGAAAGA, Rv TCCTCGTCATGTAAGTCCAGCTCT), primir17-92 (Fwd ATGTCAGCACGATCCACATGATCC, Rv AGAAAGTACCTGGCAGGCTTCCTA) and Pten (Fwd ATTCCCAGTCAGAGGCGCTATGTA, Rv TTGCAAGTTCCGCCACTGAACA). The abundance of mRNA was measured using the standard curve method and normalized against the housekeeping gene H3f3b (Fwd CCAGAAATCGACTGAGCTGCTCAT, Rv GCTGCACTTTGAAACCTCAAGTCG).

miRNA extraction and RT-qPCR

Total RNA were isolated from liver and plasma samples using the Nucleospin miRNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to manufacturer instructions. A total of 100ng (liver samples) or 2 μ L (plasma samples) of miRNA was reverse transcribed using TaqManTM MicroRNA Reversed Transcription Kit (liver samples; Thermo Fischer Scientific) or TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (plasma samples; Thermo Fischer Scientific). Quantitative real-time PCR were performed in duplicate using TaqMan gene expression and an ABI StepOnePlus PCR system (ThermoFischer Scientific). Taqman miRNA Assays hsa-miR-19a-3p (#000395), hsa-miR-19b-3p (#000396) and RNU6B (#001093) were used for liver samples. TaqMan advanced miRNA assays (Thermo Fischer Scientific), hsa-miR-19a-3p (479228_mir), hsa-miR-19b-3p (478264_mir), mmu-miR-195a-5p (mmu482953-mir) were used for plasma samples. The abundance of miRNA was measured using the comparative CT method and normalized against RNU6B and mir195a-5p in liver and plasma samples respectively.

Statistical analysis.

Prism 6 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for all statistical analysis. Means are presented \pm SEM. Outliers were identified by ROUT test. Differences between diet groups were assessed by either ANOVA followed by Newman Keuls *post hoc* test. Effects of diet and sex were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. *In utero* morphometric parameters and the post-natal growth curve were analyzed by repeated measures two-way ANOVA. Statistically significant results are marked with asterisks, * $p < 0.05$ were considered significant.

References

- 1 WHO. *Obesity and Overweight*, <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>> (2018).
- 2 WHO. *Global Health Observatory (GHO) data - Child health*, <http://www.who.int/gho/child_health/en/> (2016).
- 3 Hales, C. N. & Barker, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601 (1992).
- 4 Roseboom, T., de Rooij, S. & Painter, R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev* **82**, 485-491, doi:S0378-3782(06)00184-8 [pii]. 10.1016/j.earlhumdev.2006.07.001 (2006).
- 5 Karlberg, J. & Albertsson-Wikland, K. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* **38**, 733-739, doi:10.1203/00006450-199511000-00017 (1995).
- 6 Ong, K. K., Ahmed, M. L., Emmett, P. M., Preece, M. A. & Dunger, D. B. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ* **320**, 967-971 (2000).
- 7 Vehaskari, V. M., Aviles, D. H. & Manning, J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* **59**, 238-245, doi:S0085-2538(15)47458-7 [pii]. 10.1046/j.1523-1755.2001.00484.x (2001).
- 8 Nugent, B. M., O'Donnell, C. M., Epperson, C. N. & Bale, T. L. Placental H3K27me3 establishes female resilience to prenatal insults. *Nat Commun* **9**, 2555, doi:10.1038/s41467-018-04992-1. 10.1038/s41467-018-04992-1 [pii] (2018).
- 9 Sugden, M. C. & Holness, M. J. Gender-specific programming of insulin secretion and action. *J Endocrinol* **175**, 757-767 (2002).
- 10 Zambrano, E. *et al.* A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* **571**, 221-230, doi:jphysiol.2005.100313 [pii]. 10.1113/jphysiol.2005.100313 (2006).
- 11 Lucas, A., Baker, B. A., Desai, M. & Hales, C. N. Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. *Br J Nutr* **76**, 605-612, doi:S0007114596001699 [pii] (1996).
- 12 Manning, J. & Vehaskari, V. M. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* **16**, 417-422 (2001).
- 13 Bateson, P. *et al.* Developmental plasticity and human health. *Nature* **430**, 419-421 (2004).

- 14 Gluckman, P. D. & Hanson, M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 183-187, doi:10.1016/j.tem.2004.03.002 [doi]. S1043276004000578 [pii] (2004).
- 15 McMillen, I. C. & Robinson, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* **85**, 571-633 (2005).
- 16 Gatford, K. L., Simmons, R. A., De Blasio, M. J., Robinson, J. S. & Owens, J. A. Review: Placental programming of postnatal diabetes and impaired insulin action after IUGR. *Placenta* **31 Suppl**, S60-65, doi:10.1016/j.placenta.2009.12.015. S0143-4004(09)00405-6 [pii] (2010).
- 17 Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-838, doi:10.1126/science.1062961. 1062961 [pii] (2001).
- 18 Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235-240, doi:nature03120 [pii]. 10.1038/nature03120 (2004).
- 19 Saini, H. K., Enright, A. J. & Griffiths-Jones, S. Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics* **9**, 564, doi:10.1186/1471-2164-9-564. 1471-2164-9-564 [pii] (2008).
- 20 Oszolak, F. *et al.* Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* **22**, 3172-3183, doi:10.1101/gad.1706508. 22/22/3172 [pii] (2008).
- 21 He, X. *et al.* Human fibroblast reprogramming to pluripotent stem cells regulated by the miR19a/b-PTEN axis. *PLoS One* **9**, e95213, doi:10.1371/journal.pone.0095213. PONE-D-14-03621 [pii] (2014).
- 22 Feng, Y. *et al.* miR-19a acts as an oncogenic microRNA and is up-regulated in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **33**, 67, doi:10.1186/PREACCEPT-9242556491295527. s13046-014-0067-8 [pii] (2014).
- 23 Grandjean, V. *et al.* RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci Rep* **5**, 18193, doi:10.1038/srep18193. srep18193 [pii] (2015).
- 24 Qian, Y. Y., Liu, Z. S., Zhang, Z., Levenson, A. S. & Li, K. Pterostilbene increases PTEN expression through the targeted downregulation of microRNA-19a in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* **17**, 5193-5201, doi:10.3892/mmr.2018.8515 (2018).
- 25 Dou, L. *et al.* MiR-19a regulates PTEN expression to mediate glycogen synthesis in hepatocytes. *Sci Rep* **5**, 11602, doi:10.1038/srep11602. srep11602 [pii] (2015).
- 26 Dou, L. *et al.* MiR-19a mediates gluconeogenesis by targeting PTEN in hepatocytes. *Mol Med Rep* **17**, 3967-3971, doi:10.3892/mmr.2017.8312 (2018).
- 27 Takamizawa, J. *et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* **64**, 3753-3756, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0637. 64/11/3753 [pii] (2004).
- 28 Ranade, A. R. *et al.* MicroRNA 92a-2*: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **5**, 1273-1278, doi:10.1097/JTO.0b013e3181dea6be. S1556-0864(15)30590-6 [pii] (2010).

- 29 Weber, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* **56**, 1733-1741, doi:10.1373/clinchem.2010.147405. clinchem.2010.147405 [pii] (2010).
- 30 Creemers, E. E., Tijssen, A. J. & Pinto, Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* **110**, 483-495, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247452. 110/3/483 [pii] (2012).
- 31 Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10513-10518, doi:10.1073/pnas.0804549105. 0804549105 [pii] (2008).
- 32 Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* **18**, 997-1006, doi:10.1038/cr.2008.282. cr2008282 [pii] (2008).
- 33 Lopez-Riera, M. *et al.* Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. *Sci Rep* **8**, 10606, doi:10.1038/s41598-018-28854-4. 10.1038/s41598-018-28854-4 [pii] (2018).
- 34 Fiorotto, M. L., Burrin, D. G., Perez, M. & Reeds, P. J. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol* **260**, R1104-1113 (1991).
- 35 Kappeler, L. *et al.* Early postnatal nutrition determines somatotropic function in mice. *Endocrinology* **150**, 314-323, doi:en.2008-0981 [pii]. 10.1210/en.2008-0981 (2009).
- 36 Decourtye, L. *et al.* IGF-1 Induces GHRH Neuronal Axon Elongation during Early Postnatal Life in Mice. *PLoS One* **12**, e0170083, doi:10.1371/journal.pone.0170083. PONE-D-16-31120 [pii] (2017).
- 37 Dahl, J. A. & Collas, P. A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (microChIP). *Nat Protoc* **3**, 1032-1045, doi:nprot.2008.68 [pii]. 10.1038/nprot.2008.68 (2008).

Acknowledgment

Authors wish to thanks T. Ledent and the staff of the PHEA platform of the St Antoine Research Centre for animal care, S. Placier and C. Chatziantoniou from the hemodynamic platform of Tenon Hospital for help during arterial tension measurements as well as the staff of P3S platform of the UMS OMICS for ChIPSequencing.

Legends

Figure 1: Nutritional changes during lactation modulate long term consequences of IUGR on growth in female and male mice.

(A) *In utero* body weight (top panel) and naso-anal length (bottom panel) were measured at E₁₅, E₁₇ and E₁₈ in male and female Control and IUGR embryos. The impact of maternal regimen on both parameters were more pronounced in males with significant differences starting at E₁₇ in males compared to E₁₈ in females. (B) Postnatal growth curves from day 5 to day 90 in Control (dashed line), IUGR-R (blue line), IUGR-N (green line) and IUGR-O (red line) males and females mice (n=6-8 per group). Males and females IUGR-R mice remained lighter throughout the course of the study. IUGR-N and IUGR-O mice of both sexes exhibited a rapid catch up growth. From 30 days of life, males IUGR-N and IUGR-O mice gained significantly more weight than Controls. Females IUGR-O only became heavier than Control in adulthood. (C) BMI calculated with the rodent dedicated formulae of Lee Index from 3 month-old Control, IUGR-R, IUGR-N and IUGR-O in both sexes. Note an increased in Lee index in males IUGR-N and IUGR-O mice relative to Control and IUGR-R (n=6-8 per group). In females, only IUGR-O mice have an increased BMI compared to Control ones. $p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: *** between groups.

Figure 2: Liver lipid accumulation and insulin resistance are affected by nutritional changes during lactation in IUGR male mice.

(A) Representative microscopic photographs of Oil red O stained sections of livers from 3 month-old Control, IUGR-R, IUGR-N and IUGR-O male mice. Quantifications using ImageJ software (right panel) indicated strong lipid accumulation in IUGR-N and IUGR-O mice

compared to Control and IUGR-R ones (n=4 per group). **(B)** Blood glucose during a glucose tolerance test (ipGTT) from young (3 month-old, left panels) adults or old (12 month-old, right panels) Control (dashed line), IUGR-R (blue line), IUGR-N (green line) and IUGR-O (red line) male mice (n=6-12 per group). Area under the curves (AUC) calculation for young males showed differences between IUGR-R and IUGR-N/IUGR-O mice. No differences in AUC values were observed for old males. **(C)** Blood glucose during an insulin tolerance test (ITT) from young (3 month-old, left panel) adults or old (12 month-old, right panel) Control, IUGR-R, IUGR-N and IUGR-O male mice (n=6-10 per group). Area above the curves (AAC) calculation for young males indicated increased insulin sensitivity in 3 month-old IUGR-R that persists at 12 months of age and reduced insulin sensitivity in IUGR-O at 3 months of age. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ for Control vs IUGR, and the same with the following comparison symbols Δ : IUGR-O vs IUGR-R, \circ : IUGR-O vs IUGR-N, \diamond : IUGR-N vs IUGR-R. Corresponding results for females are in supplemental Figure S4. **(D)** Representative immunoblots of the S473 phosphorylated AKT (p-AKT), total AKT and Actin in the liver of mice injected with saline (Sal) or insulin (Ins). Quantifications using ImageJ software (n=3-4 per group) showed reduced p-AKT/AKT ratio following insulin stimulation compared to saline injected mice in IUGR-N and IUGR-O mice compared to Control and IUGR-R ones. $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: *** between groups.

Figure 3: Epigenetic modification in livers of young adults IUGR-N male mice.

(A) The 4 statistical analysis approaches indicate overlapping significant differential H3K4me3 peaks (adj.p-val<0.05) between 3 month-old IUGR-N and Control (n=5-6 per group) as revealed by ChIPsequencing. Statistically significant differential peaks common to Trended_edgeR and DESeq² (5'490 peaks) were conserved for further analyses. **(B)** The

heatmap for differential H3K4me3 peaks show that Control (blue group) and IUGR-N (pink group) male mice segregate from each other. (C) DAVID analysis for involved genes highlight gene ontology (GO) terms in Biological Process (BP), Cellular Component (CC) and Molecular Function (MF).

Figure 4: Insulin signaling pathway is altered in liver of young adult IUGR males.

(A) Illustrating Genome browser view of representative ChIP-seq data for H3K4me3 peak at *Akt1* gene for Control and IUGR-N. Mean number of reads is reduced in IUGR-N male mice compared to Controls (n=5-6 per group). (B) mRNA level of *Akt1* is significantly reduced in IUGR-N and tends to be lower in IUGR-O males compared to Controls and IUGR-R mice. (C) Representative immunoblots and protein quantification of the total AKT indicate reduced total AKT protein content in liver of 3 month-old IUGR-N and IUGR-O mice compared to Controls (n=6-8 per group). (D) mRNA levels of *Pten* is lower in all IUGR groups, irrespective of nutrition during the lactating period. (E) Representative immunoblots and protein quantification of the PTEN in same individuals show higher PTEN expression in IUGR-O relative to IUGR-R mice. $p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: *** between groups.

Figure 5: Plasma levels and liver contents of microRNA19a are decreased in young adult IUGR male mice.

(A) Illustrating Genome browser view of representative ChIP-seq data for H3K4me3 peak at *Dicer1* gene for Control and IUGR-N. Mean number of reads is reduced in IUGR-N male mice compared to Controls (n=5-6 per group). (B) mRNA level of *Dicer1* is lower in all 3 month-old IUGR male mice irrespective of their nutrition during the lactating period compared to Controls (n=7 per group). (C) Illustrating Genome browser view of

representative ChIP-seq data for H3K4me3 peak at *miRNA17 Host gene* (miRNA 17Hg) for Control and IUGR-N. Mean number of reads is reduced in IUGR-N male mice compared to Controls (n=5-6 per group). **(D)** The miRNA17Hg synthesizes the non-coding pri-miRNA17-92 that contains 5 different microRNAs. Pri-miRNA17-92 levels are significantly reduced in liver from young adult (3 month-old) IUGR-N and IUGR-O compared to Controls (n=6-8 per group). **(E)** This is associated with lower levels of *miR19a-3p* in the liver of IUGR-O male mice compared to Controls and IUGR-R (n=6-8 per group). **(F)** In addition, this was associated with reduced circulating *miR19a-3p* plasma levels in 3 month-old IUGR-N and IUGR-O male mice compared to Controls (n=7-8 per group). $p < 0.05$: *, $p < 0.001$: *** between groups.

Supplemental Figure S1: Mice model of IUGR and nutritional changes during lactation.

(A) Schematic representation of the mouse model. 129/SvPas2 females and C57BL/6J males maintained on normal regimen (control chow, A03) were mated to produce F1 offspring. IUGR was induced by feeding the pregnant dams with a hypo-protein/iso-caloric diet (R05) during the third week of gestation (E_{15.5}). At birth, IUGR pups were cross-fostered to a female fed with normal regimen throughout pregnancy and that gave birth the same day. IUGR litters were redistributed to yield six newborns per dam for normal milk feeding (IUGR-N), three per dam in the overfed group (IUGR-O) or 10 per dam in the dietary restricted group (IUGR-R). Control mice were produced from female on normal regimen during the entire gestation and raised in litters normalized to 6 pups per dam. **(B)** 24h food intake in Kcal and **(C)** Protein intake in gram (g) in pregnant dam was recorded from gestational day 15 to delivery and normalized per pup and per day. White bars represent control female fed control chow (n=17) and black bars represent female fed hypo-protein/iso-caloric diet (n=14). Food intake was

similar in both groups. Coherently, protein intake was reduced by 34% in female fed hypo-protein/iso-caloric diet. $p < 0.01$: **.

Supplemental Figure S2: Impact of IUGR and nutritional changes during lactation on renal development and blood pressure.

(A) Glomeruli number in 3 month-old Control, IUGR-R, IUGR-N and IUGR-O males and females. Glomeruli number was reduced in all IUGR groups in males. In females, only IUGR-O group exhibit a significant reduction in glomeruli number compared to Control (both sexes, $n=5-7$ per group). (B) Systolic (left panel) and Diastolic (right panel) blood pressures were higher in 18 month-old IUGR-N and IUGR-O males ($n=5-7$ per group).

Supplemental Figure S3: Impact of IUGR and nutritional changes during lactation on fasting insulin in male and female mice.

(A) Fasting insulin of 6h-fasted 3 month-old Control, IUGR-R, IUGR-N and IUGR-O male mice ($n=6-10$ per group) and (B) HOMA-IR indexes of same mice after intra-peritoneal glucose injections. All comparisons were non-significant.

Supplemental Figure S4: Impact of IUGR and nutritional changes during lactation on insulin sensitivity in female mice.

(A) Blood glucose during a glucose tolerance test (ipGTT) from young (3 month-old, left panels) adults or old (12 month-old, right panels) Control, IUGR-R, IUGR-N and IUGR-O female mice ($n=6-12$ per group). No differences in area under the curves (AUC) values were observed at both ages. (B) Blood glucose during an insulin tolerance test (ITT) from young (3

month-old, left panels) adults or old (12 month-old, right panels) Control, IUGR-R, IUGR-N and IUGR-O female mice (n=6-12 per group). The tendency toward decreased area above the curves (AAC) in IUGR-O at 12 months of age suggests insulin resistance in female might develop at a later age. $p < 0.05$: *: Control vs IUGR, Δ : IUGR-O vs IUGR-R.

Supplemental Figure 5: Pipeline of bioinformatics analysis.

Sequencing data was filtered and trimmed to get good-quality reads with Grep and Sickle softwares. The pre-processed reads were then mapped to the reference genome mm9 (UCSC) with Bowtie. Only the uniquely mapped reads were used for further analysis. The distribution of uniquely mapped reads was analyzed: reads enrichment region (peak) was scanned from the whole genome with MACS. After peak scanning, the distribution of peaks was analyzed with CEAS, and the differential binding sites between Control and IUGR groups were analyzed with DiffBind package from R/Bioconductor.

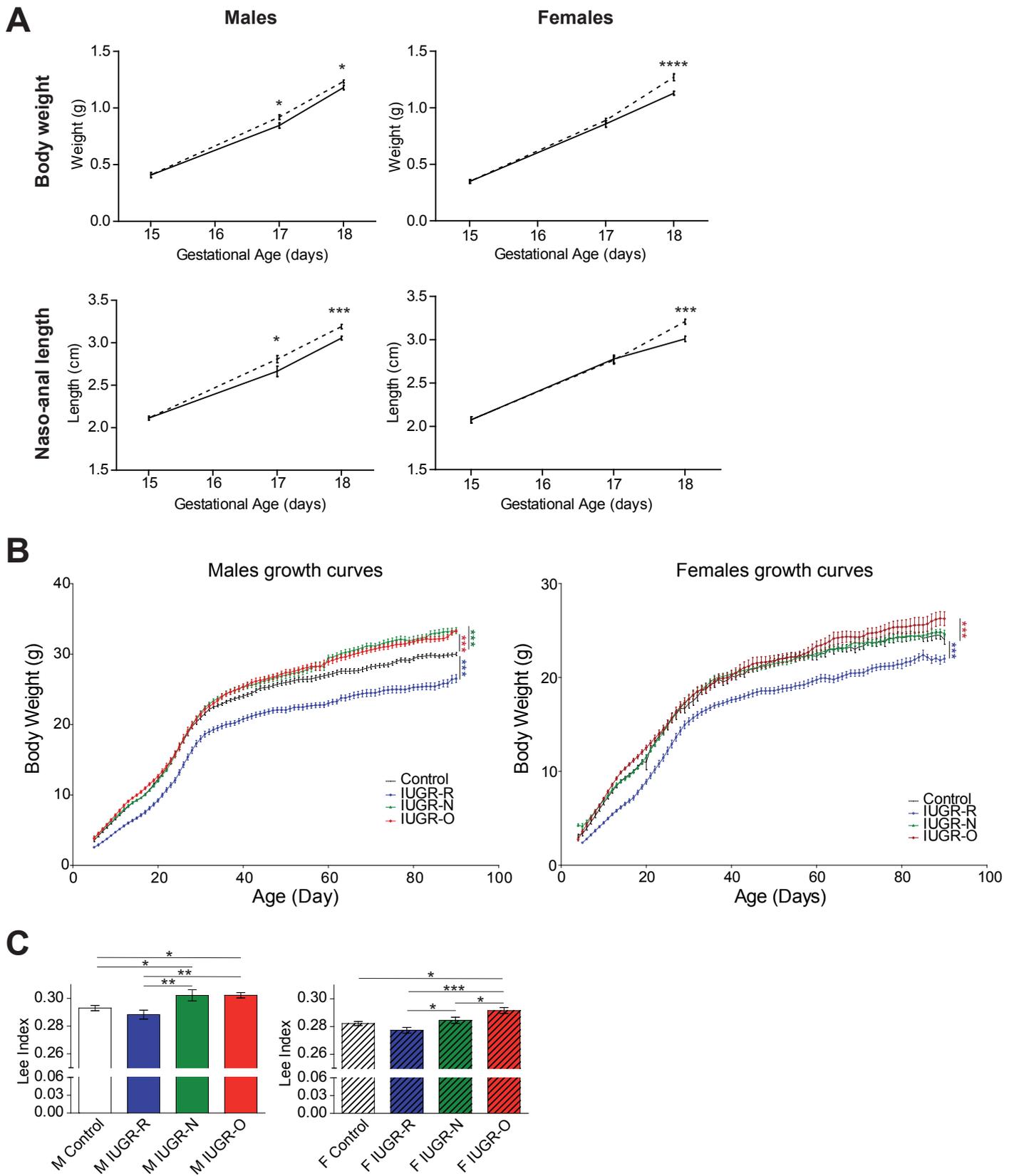
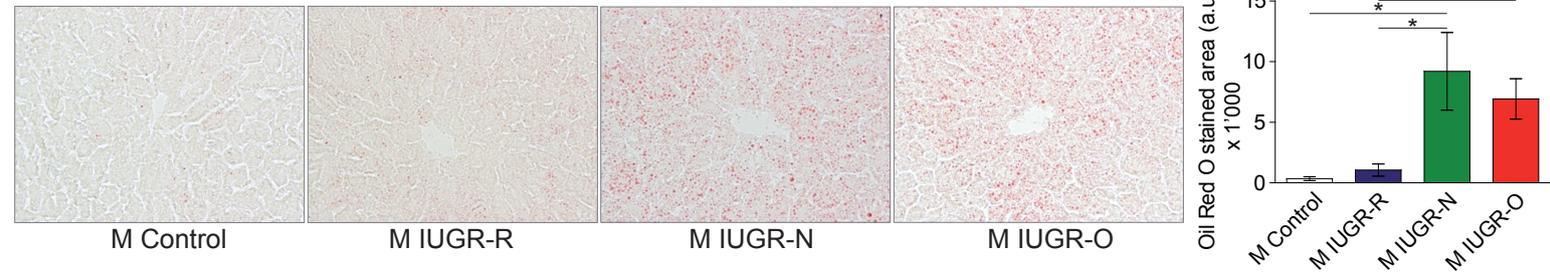
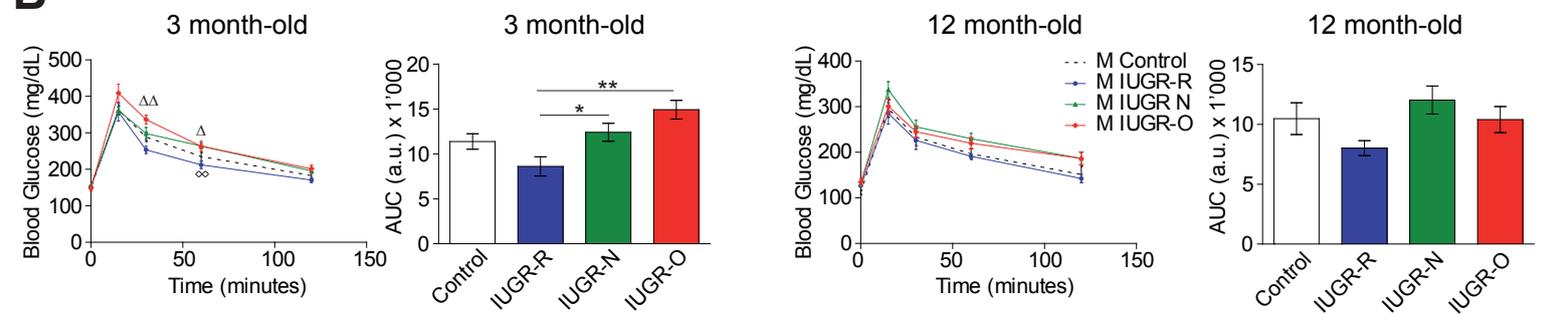
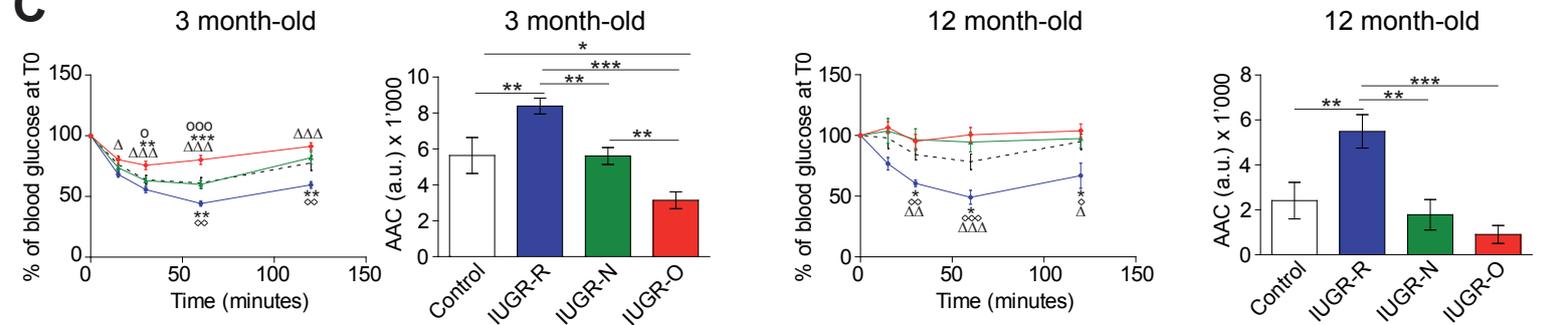
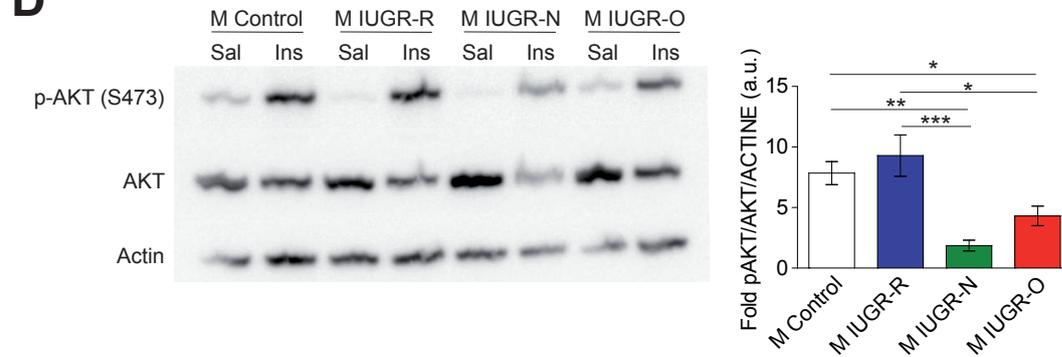
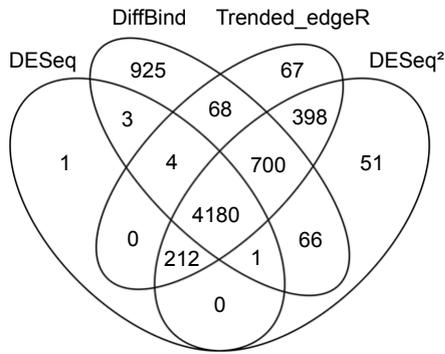
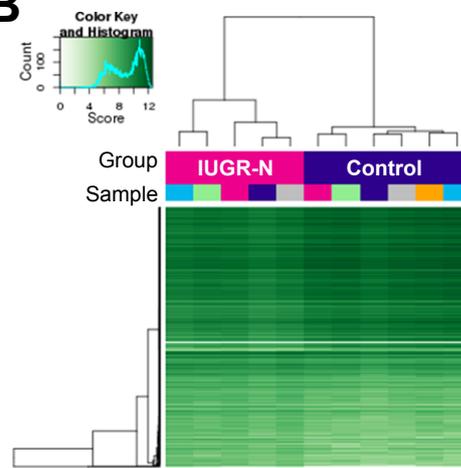
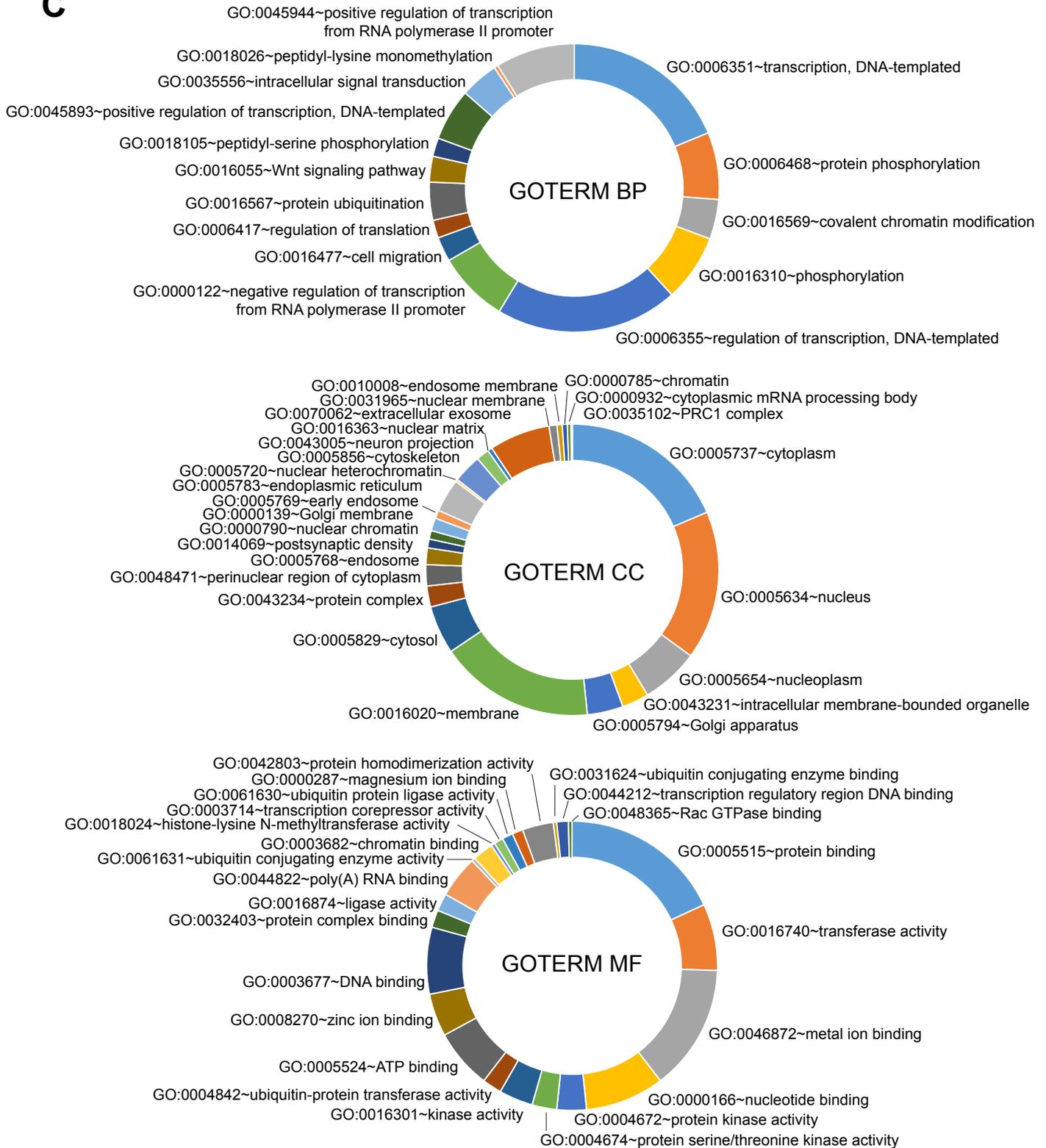


Figure 1

A**B****C****D****Figure 2**

A**B****C****Figure 3**

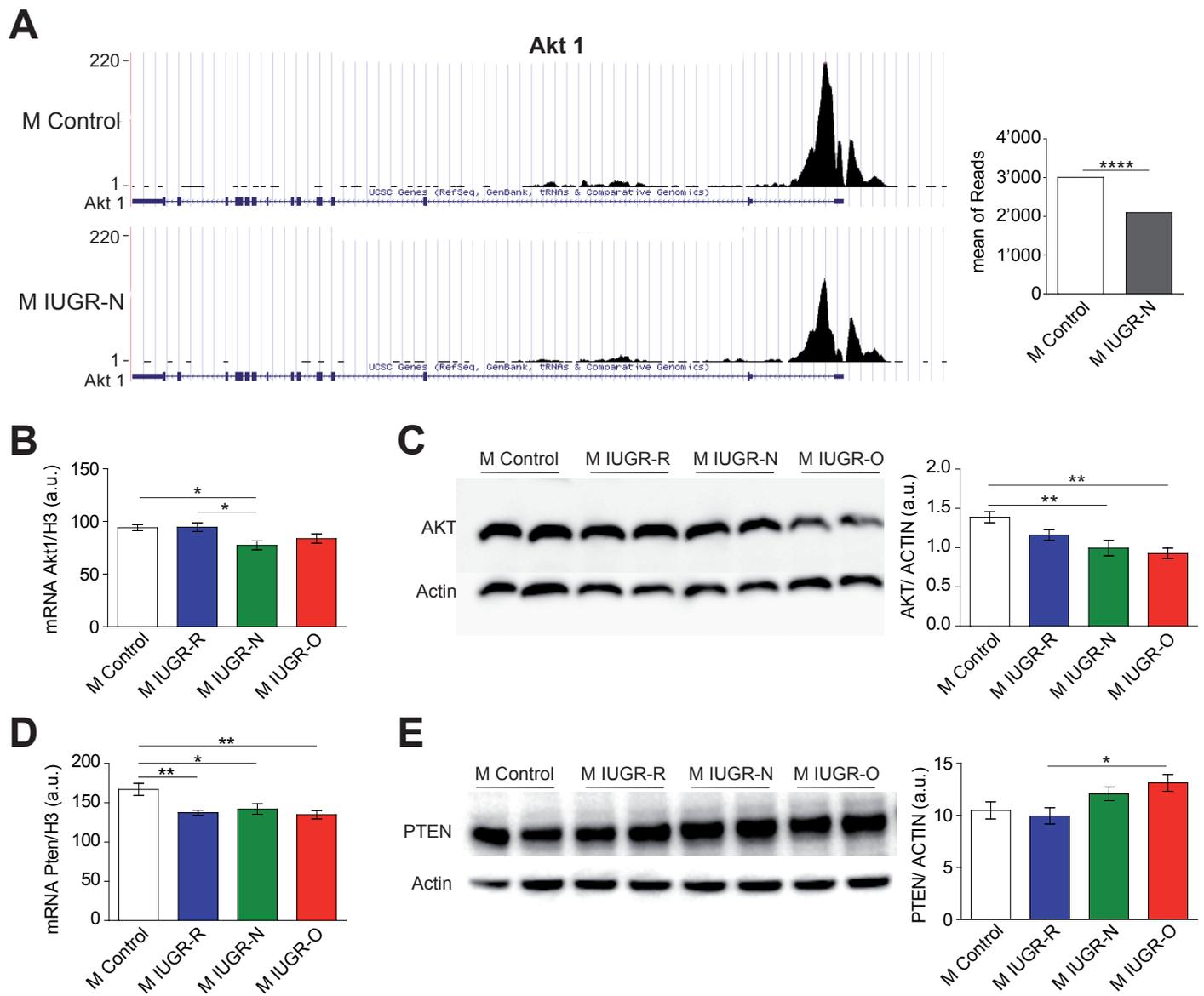


Figure 4

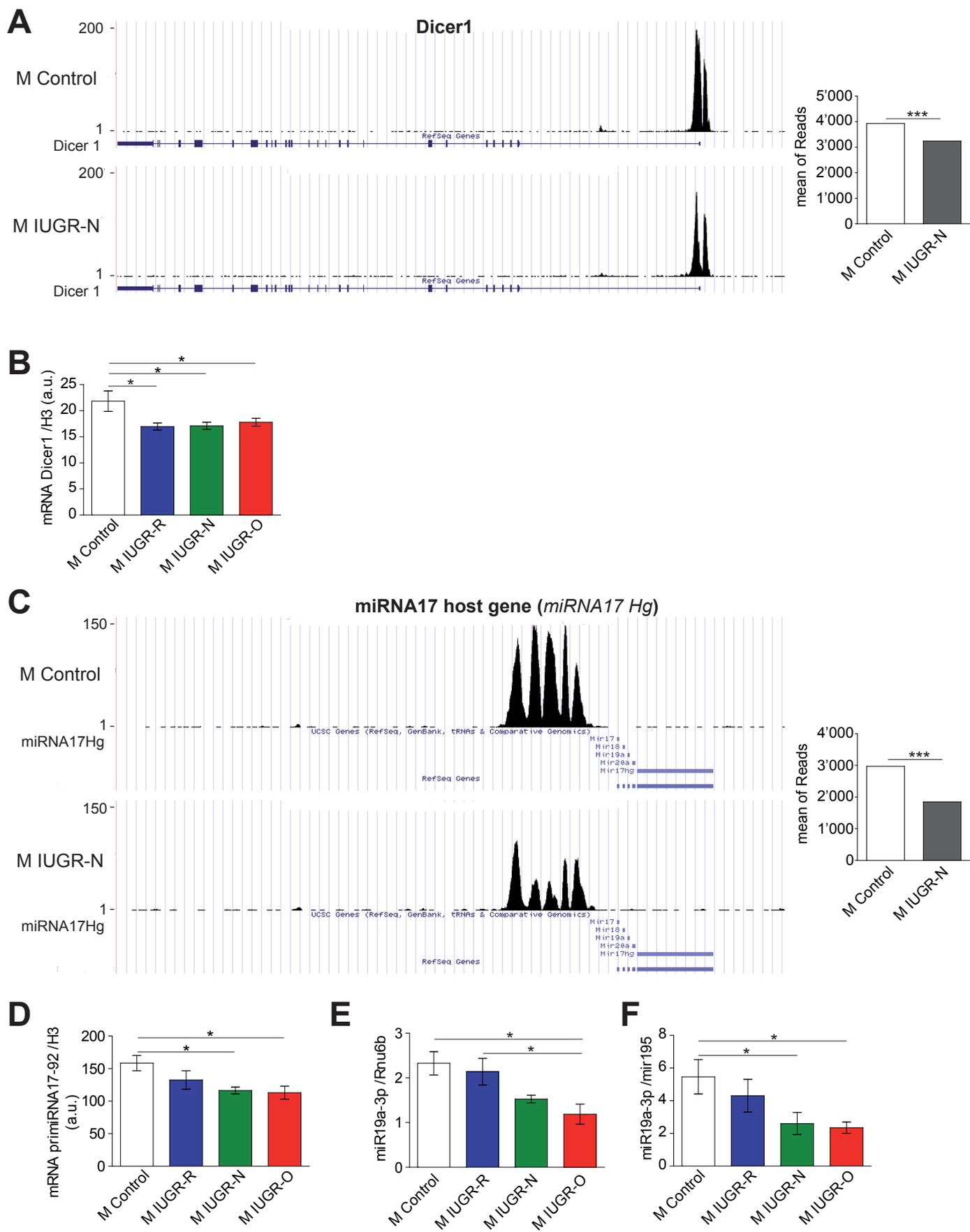


Figure 5

Supplementary Table 1. Organ weights in 3 months-old male and female IUGR mice. Animal's number for each group are indicated between brackets. For each organ, absolute values are indicated in g and relative values (% of body weight) are given below in italic type. Data are presented as mean \pm SEM. Two-way ANOVAs were performed to evaluate diet effect, sex effect and their interaction. Tukey's post hoc revealed significant differences shown within sex; values not sharing letters are significantly different, $p < 0.05$.

	Male				Female				Two-way ANOVA		
	Control [11-12]	IUGR-R [9-10]	IUGR-N [9-10]	IUGR-O [9-14]	Control [9-10]	IUGR-R [13-15]	IUGR-N [13-14]	IUGR-O [9-12]	Diet	Sex	Interaction
Body Weight	28.92 \pm 0.30 ^(a)	23.7 \pm 0.68 ^(b)	30.32 \pm 0.54 ^(c)	29.79 \pm 0.58 ^(c)	24.37 \pm 0.40 ^(ac)	20.6 \pm 0.45 ^(b)	21.96 \pm 0.36 ^(a)	24.09 \pm 0.64 ^(c)	<0.001	<0.001	<0.001
Brain	0.465 \pm 0.005	0.459 \pm 0.005	0.488 \pm 0.004	0.484 \pm 0.004	0.473 \pm 0.007 ^(a)	0.458 \pm 0.007 ^(a)	0.474 \pm 0.007 ^(a)	0.508 \pm 0.006 ^(b)	<0.001	NS	<0.05
	<i>15.26\pm0.18 ^(a)</i>	<i>17.25\pm0.39 ^(b)</i>	<i>14.67\pm0.30 ^(a)</i>	<i>15.15\pm0.36 ^(a)</i>	<i>18.25\pm0.30 ^(a)</i>	<i>20.15\pm0.35 ^(b)</i>	<i>19.16\pm0.47 ^(ab)</i>	<i>19.25\pm0.63 ^(ab)</i>	<0.001	<0.001	NS
Heart	0.168 \pm 0.005 ^(a)	0.144 \pm 0.005 ^(b)	0.169 \pm 0.005 ^(a)	0.171 \pm 0.003 ^(a)	0.134 \pm 0.006 ^(ab)	0.116 \pm 0.002 ^(a)	0.140 \pm 0.005 ^(b)	0.141 \pm 0.006 ^(b)	<0.001	<0.001	NS
	<i>54.98\pm1.91</i>	<i>52.53\pm0.82</i>	<i>51.8\pm1.30</i>	<i>53.77\pm1.32</i>	<i>51.1\pm1.93</i>	<i>51.43\pm0.86</i>	<i>54.67\pm1.77</i>	<i>54.67\pm1.89</i>	NS	NS	NS
Liver	1.21 \pm 0.02 ^(a)	1.03 \pm 0.04 ^(b)	1.37 \pm 0.05 ^(c)	1.31 \pm 0.03 ^(ac)	1.12 \pm 0.03 ^(a)	0.92 \pm 0.03 ^(b)	1.04 \pm 0.02 ^(ab)	1.11 \pm 0.04 ^(a)	<0.001	<0.001	<0.01
	<i>39.41\pm0.55</i>	<i>39.16\pm0.66</i>	<i>40.48\pm0.95</i>	<i>39.87\pm0.44</i>	<i>42.55\pm0.73</i>	<i>40.91\pm0.55</i>	<i>41.76\pm0.60</i>	<i>41.54\pm0.68</i>	NS	<0.001	NS
Pancreas	0.216 \pm 0.009	0.217 \pm 0.015	0.237 \pm 0.009	0.248 \pm 0.010	0.197 \pm 0.005	0.196 \pm 0.011	0.194 \pm 0.005	0.211 \pm 0.008	0.0678	<0.001	NS
	<i>70.94\pm2.58</i>	<i>82.85\pm4.36</i>	<i>70.94\pm2.38</i>	<i>76.91\pm1.83</i>	<i>75.2\pm1.23</i>	<i>87.39\pm4.67</i>	<i>77.94\pm2.01</i>	<i>80.0\pm1.11</i>	<0.001	<0.05	NS
Kidney	0.218 \pm 0.004 ^(ab)	0.202 \pm 0.004 ^(a)	0.239 \pm 0.006 ^(b)	0.235 \pm 0.006 ^(b)	0.175 \pm 0.007 ^(a)	0.148 \pm 0.005 ^(b)	0.166 \pm 0.007 ^(ab)	0.176 \pm 0.006 ^(a)	<0.001	<0.001	NS
	<i>71.63\pm1.16</i>	<i>74.99\pm1.54</i>	<i>71.34\pm1.32</i>	<i>71.17\pm1.44</i>	<i>66.79\pm2.55</i>	<i>64.86\pm1.65</i>	<i>65.6\pm1.90</i>	<i>64.3\pm1.43</i>	NS	<0.001	NS
Perirenal fat	0.100 \pm 0.010 ^(ab)	0.082 \pm 0.011 ^(a)	0.124 \pm 0.014 ^(ab)	0.139 \pm 0.010 ^(b)	0.095 \pm 0.008	0.087 \pm 0.011	0.092 \pm 0.009	0.102 \pm 0.009	<0.05	<0.05	NS
	<i>29.21\pm2.69</i>	<i>30.8\pm3.79</i>	<i>35.11\pm3.76</i>	<i>41.87\pm2.62</i>	<i>36.23\pm3.12</i>	<i>37.19\pm4.25</i>	<i>36.89\pm3.41</i>	<i>38.9\pm3.33</i>	NS	NS	NS
Gonadal fat	0.293 \pm 0.028	0.233 \pm 0.020	0.352 \pm 0.040	0.350 \pm 0.022	0.203 \pm 0.014 ^(a)	0.186 \pm 0.026 ^(a)	0.226 \pm 0.023 ^(a)	0.476 \pm 0.050 ^(b)	<0.001	<0.001	0.0982
	<i>90.58\pm8.06</i>	<i>86.8\pm6.58</i>	<i>104.3\pm10.64</i>	<i>106.3\pm5.87</i>	<i>76.83\pm4.74 ^(a)</i>	<i>79.6\pm9.51 ^(a)</i>	<i>90.0\pm8.23 ^(a)</i>	<i>154.5\pm17.38 ^(b)</i>	<0.001	NS	<0.01
Inguinal fat	0.250 \pm 0.027 ^(ab)	0.171 \pm 0.016 ^(a)	0.247 \pm 0.026 ^(ab)	0.339 \pm 0.028 ^(b)	0.258 \pm 0.012	0.175 \pm 0.013	0.257 \pm 0.022	0.379 \pm 0.058	<0.001	NS	NS
	<i>76.5\pm7.90</i>	<i>64.01\pm5.96</i>	<i>73.55\pm6.70</i>	<i>102.7\pm7.71</i>	<i>98.71\pm4.71 ^(ab)</i>	<i>76.29\pm4.56 ^(a)</i>	<i>102.6\pm7.67 ^(ab)</i>	<i>139.1\pm18.13 ^(b)</i>	<0.001	<0.001	NS

Main nutrients			Amino acids per Kg		
Protein	16.9	%	Arginine	8.0	g
Fat	4.3	%	Cysteine	3.5	g
Fiber	4.3	%	Histidine	4.0	g
Ash	7.0	%	Isoleucine	6.5	g
Dry matter	88.0	%	Leucine	17.0	g
			Lysine	8.0	g
Energy/kg			Methionine	4.0	g
ME (metabolic)	13.1	MJ	Phenylalanine	8.5	g
			Threonine	6.0	g
Minerals per kg			Tryptophan	2.0	g
Calcium	10.0	g	Tyrosine	6.0	g
Phosphorus	6.5	g			
Sodium	3.0	g	Vitamins per Kg		
Magnesium	2.5	g	Vit. A	15'000	I.U.
Iron	200.0	mg	Vit. D3	1'200	I.U.
Iodine	4.0	mg	Vit. E	90	mg
Copper	15.0	mg	Vit. K	5	mg
Cobalt	1.5	mg	Thiamine (B1)	15	mg
Manganese	120	mg	Riboflavin (B2)	10	mg
Selenium	0.2	mg	Pyridoxine (B6)	10	mg
Zinc	75.0	mg	Cobalamin (B12)	50	mg
			Biotin	200	µg
Fatty acids per kg			Choline	1.000	mg
Palmitic acid	5.0	g	Folic acid	2	mg
Stearic acid	2.0	g	Niacin	40	mg
Arachidic acid	0.1	g	Pantothenic acid	20	mg
Oleic acid	9.0	g			
Linoleic acid	19.0	g			
Linolenic acid	7.5	g			

Supplementary Table 2 : Composition of the stabulation chow diet LasQCdiet Rod16-R.

Composition adapted from LASvendi website

Main nutrients			Amino acids per Kg		
Protein	21.4	%	Arginine	14.0	g
Fat	5.1	%	Cystin	3.2	g
Fiber	4.0	%	Lysine	11.5	g
Ash	5.4	%	Methionine	4.4	g
Dry matter	87.9	%	Tryptophan	2.6	g
			Glycine	12.0	g
Energy/kg			Vitamins per Kg		
ME (metabolic)	13.55	MJ	Vit. A	14'000	I.U.
Minerals per kg			Vit. D3	2'000	I.U.
Calcium	8.2	g	Vit. E	50	I.U.
Phosphorus	5.9	g	Vit. K3	5.7	mg
Sodium	2.8	g	Thiamine (B1)	8	mg
potassium	8.6	g	Riboflavin (B2)	13	mg
Magnesium	2.0	g	Pyridoxine (B6)	3.5	mg
Iron	280.0	mg	Cobalamin (B12)	0.02	mg
Manganese	90.0	mg	Biotin	100	µg
Copper	18.0	mg	Choline	2.1	g
Chloride	4.1	g	Folic acid	0.5	mg
Zinc	64.0	mg	Niacin	90	mg
			Pantothenic (B5)	15	mg
Fatty acids per kg					
Palmitic acid	7.6	g	Oleic acid	10.0	g
Palmitoleic acid	0.5	g	Linoleic acid	25.0	g
Stearic acid	1.5	g	Linolenic acid	2.8	g

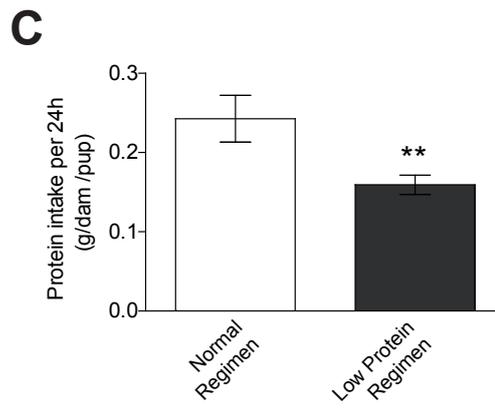
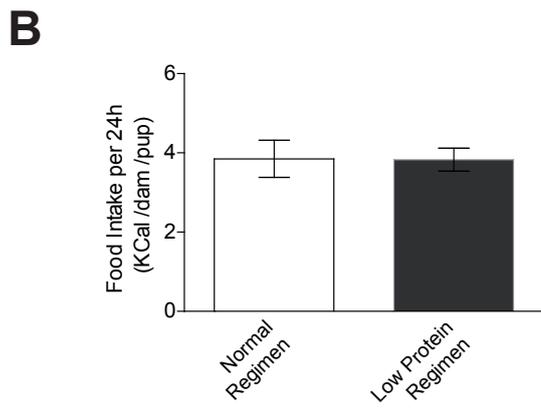
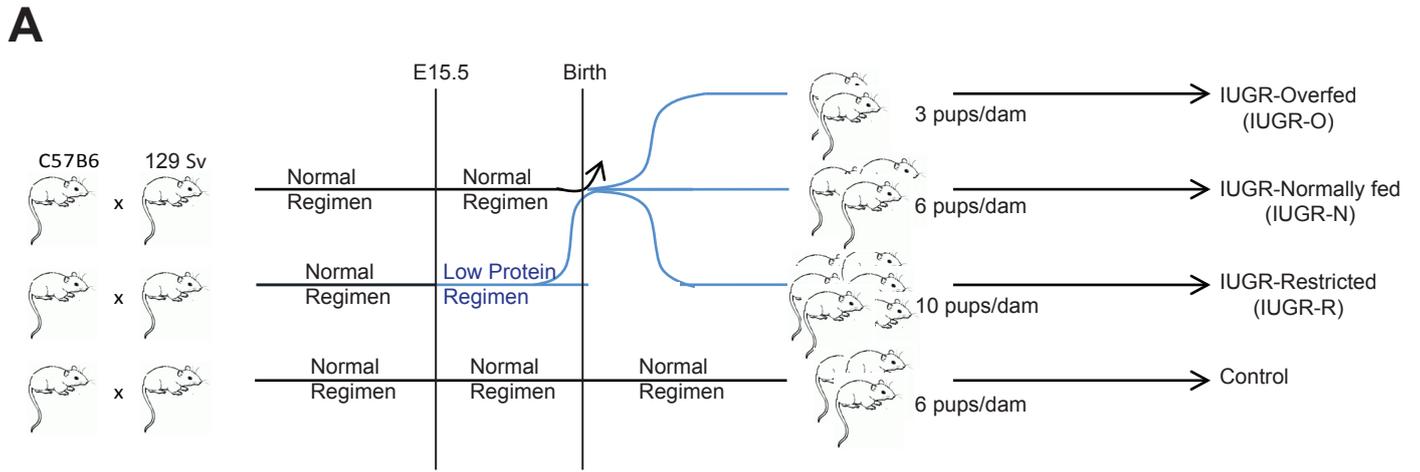
Supplementary Table 3: Composition of the Control chow diet A03.

Adapted from Safe Diets website.

Main nutrients			Amino acids per Kg		
Protein	11.8	%	Arginine	6.5	g
Fat	3.1	%	Cystin	2.0	g
Fiber	5.9	%	Lysine	4.4	g
Ash	5.5	%	Methionine	1.8	g
Dry matter	88.	%	Tryptophan	1.5	g
			Glycine	5.3	g
Energy/kg			Vitamins per Kg		
ME (metabolic)	11.87	MJ	Vit. A	5'000	I.U.
			Vit. D3	9'000	I.U.
Minerals per kg			Vit. E	25	mg.
Calcium	8.5	g	Vit. K3	2.5	mg
Phosphorus	5.0	g	Thiamine (B1)	5	mg
Sodium	2.2	g	Riboflavin (B2)	6	mg
potassium	6.3	g	Pyridoxine (B6)	2.0	mg
Magnesium	1.9	g	Cobalamin (B12)	0.02	mg
Iron	270.0	mg	Biotin	40	µg
Manganese	90.0	mg	Choline	1.6	g
Copper	16.0	mg	Folic acid	0.5	mg
Chloride	3.5	g	Niacin	70	mg
Zinc	60.0	mg	Pantothenic (B5)	10	mg
Fatty acids per kg					
Palmitic acid	2.2	g	Linoleic acid	11.2	g
Stearic acid	0.4	g	Linolenic acid	0.4	g
Oleic acid	6.0	g			

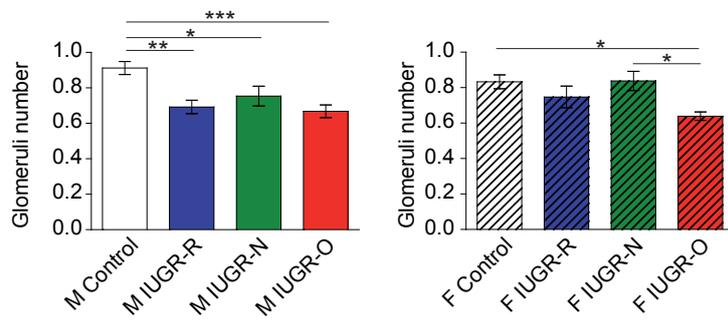
Supplementary Table 4: Composition of the low-Protein chow diet R05.

Adapted from Safe Diets website.

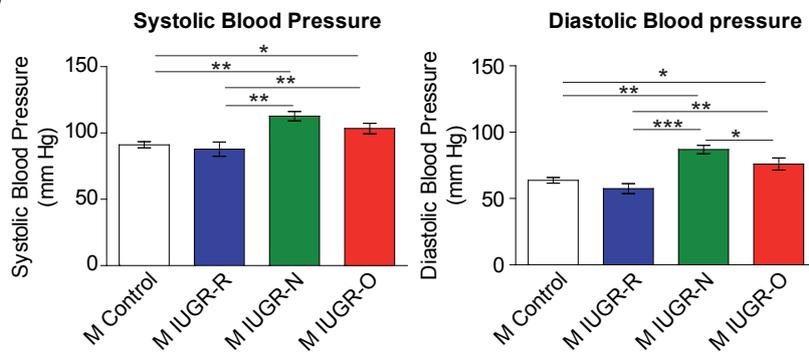


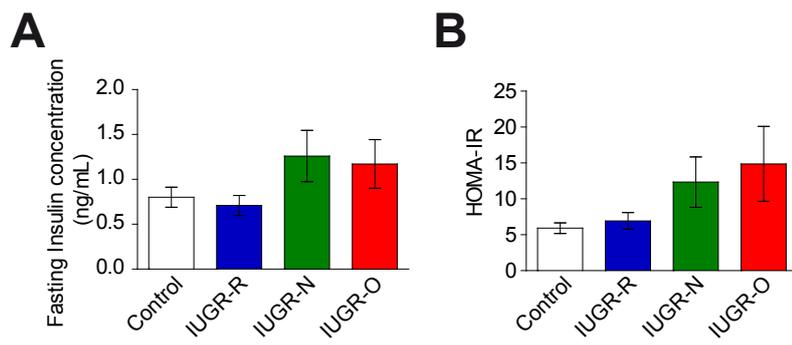
Supplementary Figure S1

A

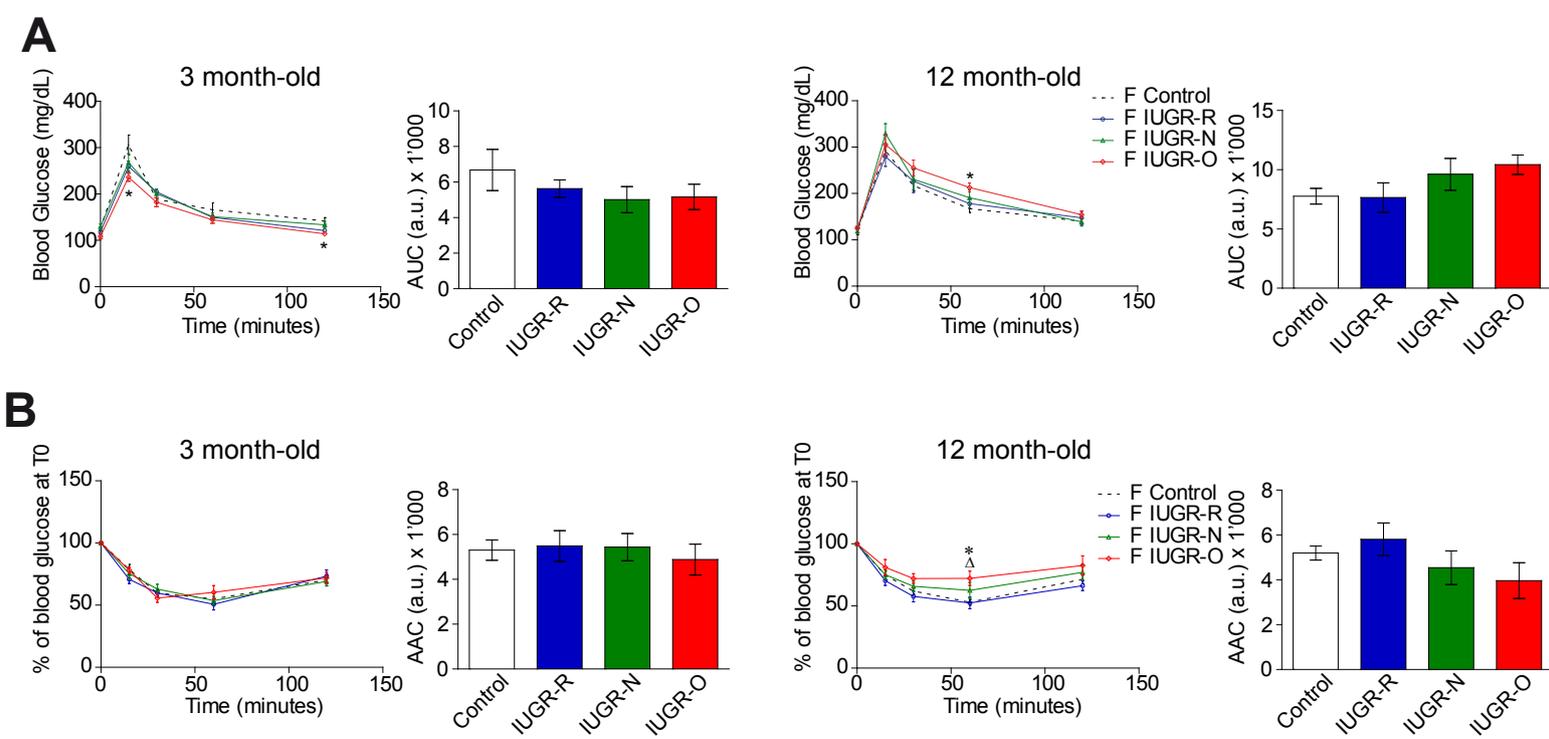


B

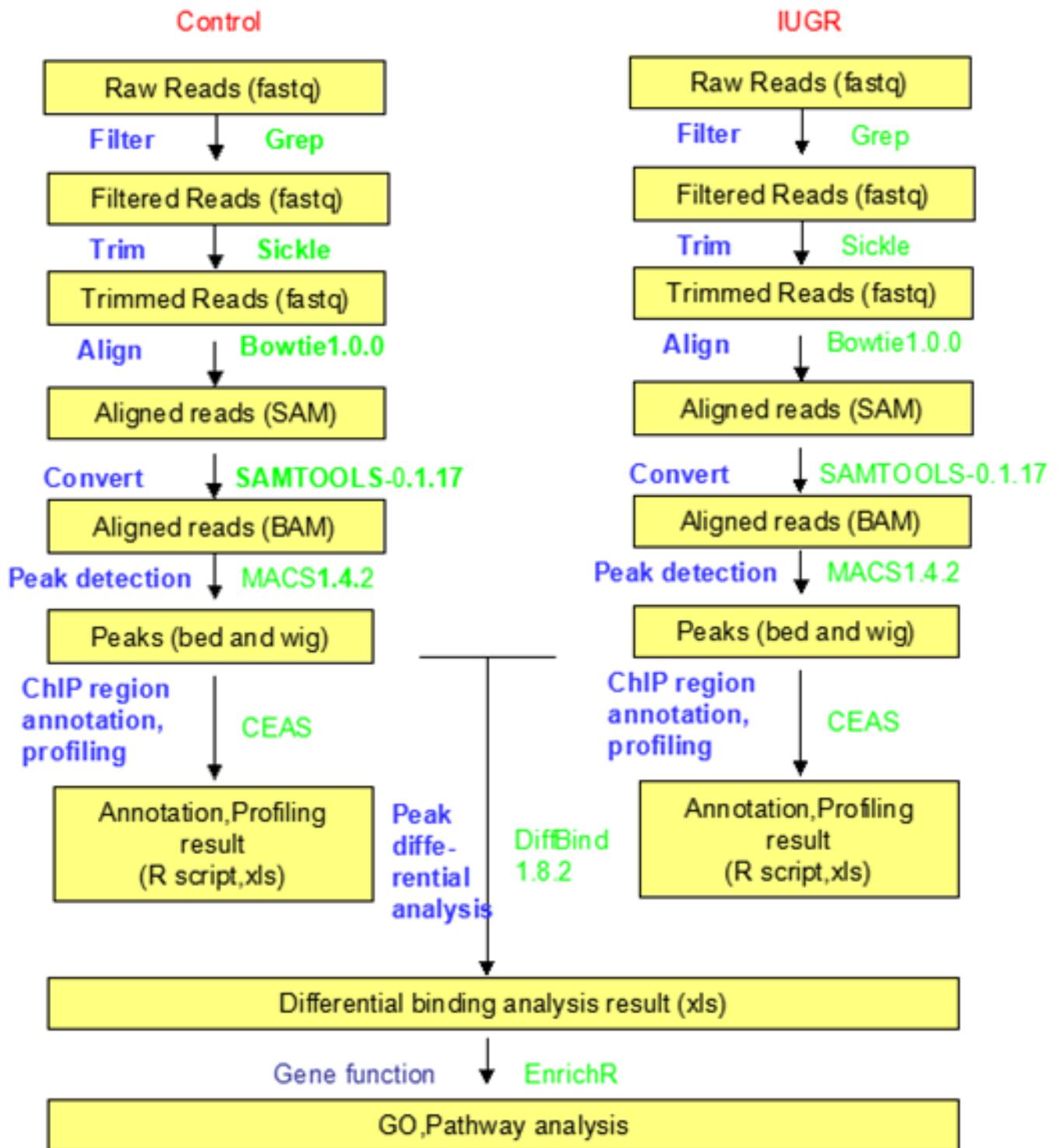




Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S5

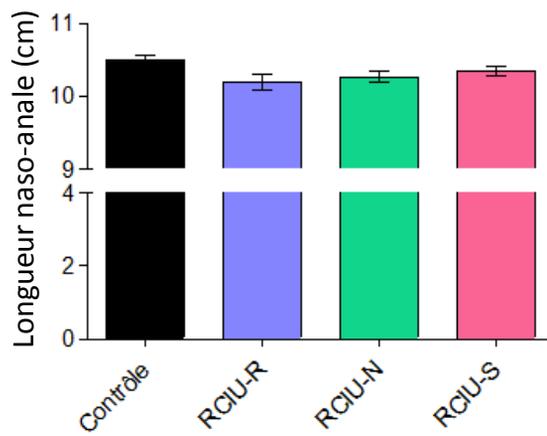


Figure 16: Taille à 3 mois chez les souris RCIU femelles en fonction de la nutrition périnatale. La taille à l'âge de 3 mois des différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, n=8-13 par groupe. Statistique : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls.

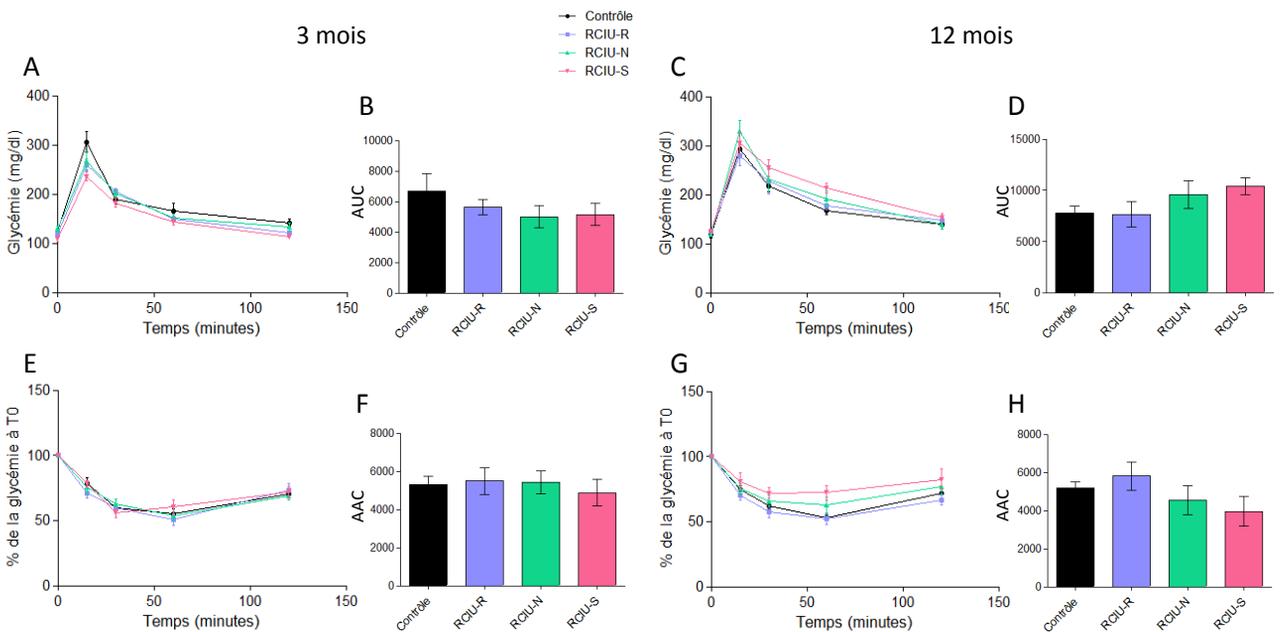


Figure 17: ipGTT et ITT à l'âge de 3 mois et 12 mois chez les souris femelles. Un test de tolérance au glucose et un test de sensibilité à l'insuline ont été réalisés à 3 mois (respectivement **A**, **E**) et 12 mois (**C**, **G**) dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Les aires sous les courbes (**B**, **D**) et au dessus des courbes (**F**, **H**) ont été quantifiées. Moyenne \pm SEM, n=8-10 par groupe. Statistique : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls.

Résultats et Discussion :

Dans cette étude, nous avons tout d'abord validé l'induction du RCIU chez les fœtus avec la mesure de la taille naso-anale et la pesée des fœtus à différents âge fœtal (E15.5 : jour de l'induction, E17.5 et E18.5). Nous avons observé un dimorphisme sexuel dans la sensibilité à la restriction maternelle protéique dès le stade fœtal : les mâles semblent être affectés rapidement après la mise en place du régime alimentaire, avec une différence significative du poids et de la taille à partir du 17^{ème} jour de gestation. Chez les femelles en revanche, l'impact de la restriction semble plus tardif avec une altération de la taille et du poids significative à partir du 18^{ème} jour de gestation. Nous avons ensuite caractérisé nos différents groupes de souris au cours du développement post-natal et à l'âge adulte.

Chez les femelles, nous avons observé que les souris nées avec un RCIU présentaient globalement une tendance à être plus petites (**Figure 16**). Le suivi du poids corporel durant les 3 premiers mois de vie a indiqué que les souris RCIU-R ne présentaient pas de rattrapage de la croissance. Les souris RCIU-S, quant à elle, tendent à devenir plus lourdes. Nous avons ensuite réalisé des tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline par injection intra-péritonéale dans nos différents groupes de souris à l'âge de 3 et 12 mois afin de voir si nos souris développaient une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. A l'âge de 3 mois, nous n'avons pas observé de différence dans la réponse à ces deux tests entre nos différents groupes de souris (**Figure 17A/E**). A l'âge de 12 mois, nous n'avons pas observé de différences significatives non plus (**Figure 17C/G**). Cependant, pour les souris RCIU-S, il y a une tendance à avoir une augmentation de l'aire sous la courbe après le test de tolérance au glucose (**Figure 17D**) et une très légère baisse de l'aire au-dessus de la courbe suite à un test de sensibilité à l'insuline (**Figure 17H**). La tendance observée chez les souris RCIU-S suggère que ces souris pourraient développer des pathologies métaboliques à un âge plus avancé ou si elles étaient mises sous un régime riche en graisses.

Chez les mâles RCIU, la restriction nutritionnelle durant la lactation des souriceaux RCIU (RCIU-R) entraîne une diminution pondérale permanente. Cette diminution est associée à une diminution de la taille à l'âge de 3 mois (**Figure 18A**) et de manière cohérente à une diminution de la concentration plasmatique d'IGF1 l'âge de 3 mois (**Figure 18B**). Les divers tests physiologiques réalisés *in vivo* (tests de tolérance au glucose par voies

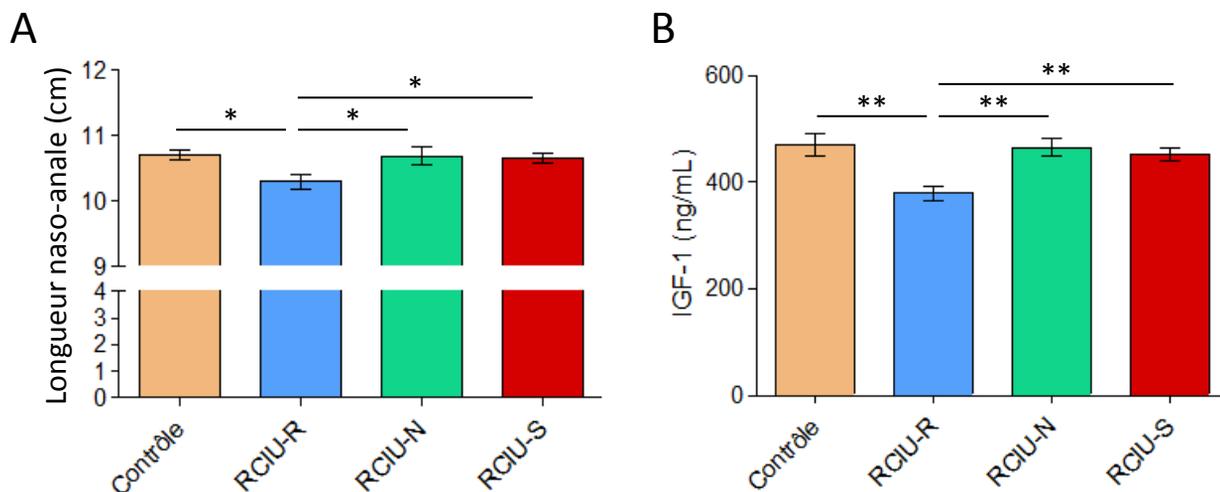


Figure 18: Taille et concentration en IGF-1 à 3 mois chez les souris RCIU mâles en fonction de la nutrition périnatale. La taille (**A**) et la concentration en IGF-1 plasmatique (**B**) à l'âge de 3 mois des différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, n=8-13 par groupe. Statistique : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls.

intra-péritonéale (ip). et orale - ip-GTT, o-GTT- et tests de sensibilité à l'insuline -ITT-) ont montré que ces souris sont très sensibles à l'insuline (3 et 12 mois). Ceci est associé à une absence de dépôts lipidiques dans le foie (coloration oil red'O) à l'âge adulte (3 et 18 mois).

A l'inverse, la nutrition normale (RCIU-N) ou la surnutrition (RCIU-S) durant la lactation des souriceaux nés avec un RCIU est associée à un surpoids à partir de l'âge d'1 mois sans altération de la taille ou de la concentration en IGF1 (**Figure 18A/B**). Ceci est associé à une augmentation permanente de l'IMC (Index de Lee) et des tissus adipeux gonadique et sous-cutané. Concernant le développement de potentielles pathologies métaboliques, nous avons observé que les souris RCIU-S présentaient une diminution de leur sensibilité à l'insuline (ITT) dès l'âge de 3 mois. Cette insensibilité apparaît à l'âge de 12 mois chez les RCIU-N. De plus, les souris RCIU-N et RCIU-S présentent également une accumulation hépatique de lipides dès l'âge de 3 mois qui persiste et évolue avec l'âge (18 mois). Enfin, j'ai complété la validation de ce modèle en confirmant que les souris RCIU-N et RCIU-S développaient une hypertension artérielle spontanée avec l'âge (18 mois). Une collaboration a été initiée avec les Drs. V. Bereziat et M. Moldes et est actuellement en cours afin d'étudier l'impact de la modification de l'alimentation en période périnatale sur la morphologie et certaines caractéristiques phénotypiques des tissus adipeux gonadiques et sous cutanées.

Au vu de ces différents résultats nous avons pu observer que le dimorphisme sexuel observé dès la période fœtale était associé également à des différences à l'âge adulte (ceci sera discuté dans la discussion). Nous avons donc décidé de nous concentrer sur les mâles pour le reste de l'étude.

Au niveau moléculaire, nous avons pu associer la diminution de la sensibilité à l'insuline à une diminution de la phosphorylation d'AKT au niveau hépatique. Cette altération a été retrouvée dès l'âge de 3 mois dans le groupe des souris RCIU-N avant qu'elles ne développent un défaut de sensibilité à l'insuline lors du test. De plus, ce défaut est exacerbé par une baisse de la quantité protéique en AKT totale, ce qui diminue d'autant la fraction phosphorylable. Ceci pourrait notamment présager de la résistance à l'insuline observée à l'âge de 12 mois. Nous avons regardé si une altération de la phosphorylation d'AKT était retrouvée dans un autre organe insulino-sensible, le muscle. Nous avons observé une

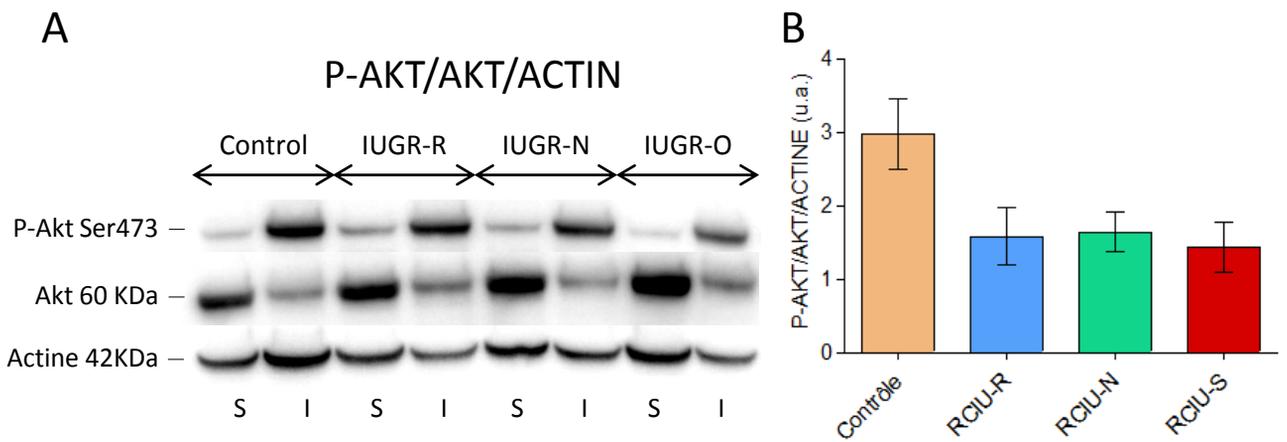


Figure 19: Phosphorylation d'AKT dans le muscle des souris RCIU en fonction de la nutrition périnatale à l'âge de 3 mois. Immunoblots illustratifs de P-AKT, AKT et l'ACTINE (**A**) et mesure du niveau de P-AKT/AKT par rapport à l'ACTINE (**B**) dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, n=5-7 par groupe. Statistique : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls.

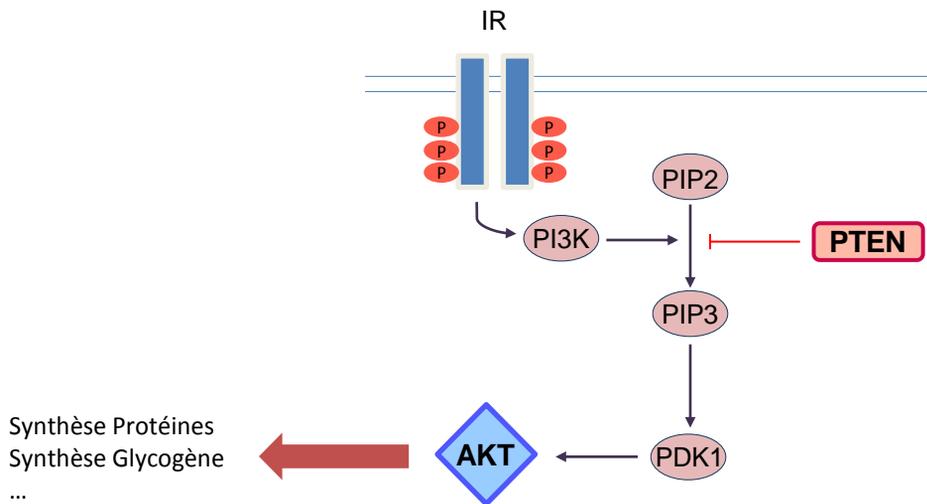


Figure 20: Voie PI3K-PTEN-AKT. En réponse à la liaison de l'insuline à son récepteur, PI3K est activé par le récepteur à tyrosine kinase et il phosphoryle PIP2 en PIP3 qui à son tour phosphoryle et active AKT. AKT va ensuite activer ou inhiber différentes voies de signalisation. PTEN est une phosphatase qui antagonise l'action de PI3K en déphosphorylant PIP3 pour générer PIP2.

Abréviations: IR : Récepteur à l'insuline ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate ; PTEN : Phosphatase and TENsin homolog.

D'après Molinari, F and Frattini, M, 2014.

tendance à la diminution de la phosphorylation d'AKT dans tous les groupes de souris suite à un RCIU (**Figure 19**). Si les résultats retrouvés pour les souris RCIU-N et RCIU-S sont cohérents avec ceux observés dans le foie, nous n'expliquons pas la baisse retrouvée chez les souris RCIU-R. Une analyse de la phosphorylation d'AKT dans le tissu adipeux sous cutané pourrait permettre d'éclairer ces données.

Nos données de CHIP-Seq, réalisées par une post-doctorante du laboratoire (Rong Cong), ont permis d'impliquer des mécanismes épigénétiques dans la dérégulation d'AKT: en effet, la marque stimulatrice d'histone H3K4me3 est diminuée au niveau du promoteur d'*Akt* chez les RCIU-N âgés de 3 mois. La diminution d'AKT a été retrouvée au niveau de l'expression du gène et au niveau protéique. Ces dérégulations s'accompagnaient également d'une augmentation du niveau protéique de PTEN, l'inhibiteur d'AKT (**Figure 20**) chez les souris RCIU-N et RCIU-S (Molinari and Frattini 2013). Les ARNm de PTEN étant diminués, nous avons pensé à une régulation post-transcriptionnelle et une potentielle implication des miARNs. En accord avec cette hypothèse, l'analyse du CHIP-Seq a également mis en évidence des altérations épigénétiques au niveau de gènes impliqués dans la maturation des miARNs (*Dicer* et *Dgcr8*) et de certains clusters de miARNs (*pri-miARN17-92*). Ces données ont été retrouvées notamment pour les taux d'ARNm de *Dicer* et de *pri-miARN17-92* mais pas pour *Dgcr8*. Le *pri-miARN17-92* est précurseur de 6 miARNs : miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b1, miR-20a et miR-92a1. Parmi les miARNs, les miR-19a-3p et miR-19b-3p sont prédits selon les bases de données de prédiction (TargetScan, miRDB) pour cibler PTEN. Nous avons observé que le miR-19a-3p était diminué dans le foie des souris RCIU-S et il y avait une tendance chez les souris RCIU-N. Le rôle du miR-19a-3p sur l'expression protéique de PTEN a été récemment validé dans des modèles de lignées cellulaires (Feng *et al.* 2014; Qian *et al.* 2018). Concernant le miR-19b-3p, son expression hépatique semblait diminuée dans tous les groupes de souris avec un effet significatif suite à une surnutrition durant la lactation (**Figure 21A**). Afin de continuer ce projet, nous souhaiterions confirmer le rôle direct du miR-19a-3p sur la régulation de PTEN dans notre modèle. Pour cela, nous voulons évaluer l'effet d'une transfection d'un antagoniste du miR-19a-3p sur des cultures d'hépatocytes provenant de souris contrôles, et à l'inverse, celui d'une transfection d'un mimic du miARN19a sur des cultures hépatocytes provenant de souris RCIU-S, sur les taux protéique de PTEN et la capacité de phosphorylation d'AKT suite à une stimulation par l'insuline. D'autre part, nous

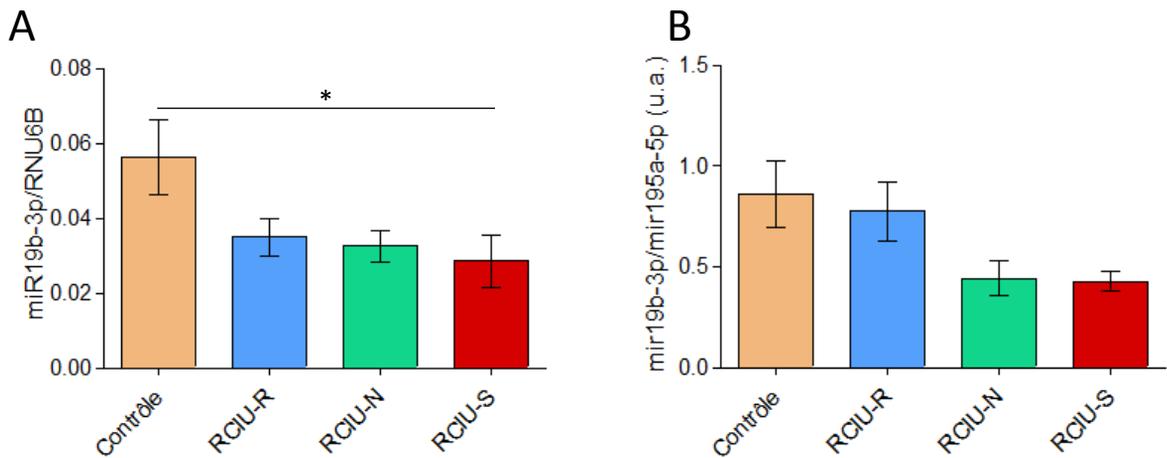


Figure 21: Expression du miR-19b-3p dans le foie et le plasma des souris RCIU en fonction de la nutrition périnatale. Niveaux d'expression du miR-19b-3p dans le foie (**A**) et du miR-19b-3p dans le plasma (**B**) dans les différents groupes de souris restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Les expressions relatives normalisées par rapport à RNU6b pour les contenus hépatiques et au miR-195a-5p pour le plasma sont présentées en unités arbitraires (u.a.). Moyenne \pm SEM, n=8 par groupe. Statistique : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls.

profiterions de ces cultures primaires pour tester le rôle du miR-19b-3p. En effet, son rôle sur PTEN a aussi été étudié dans des cultures cellulaires (Benhamou *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018). Si ces expériences sont concluantes, nous pourrions ensuite étudier l'effet de la combinaison de ces deux miARNs.

Des données de plus en plus nombreuses indiquent que les miARNs peuvent être excrétés ou sécrétés dans le sang, nous avons voulu savoir si le miR-19a-3p pouvait être retrouvé dans le plasma et si ses niveaux étaient altérés. Nous avons pu observer une baisse des taux circulants de miR-19a-3p dans le plasma des souris RCIU-N et RCIU-S âgées de 3 mois, ainsi qu'une tendance pour le miR-19b-3p (**Figure 21B**). Nous ne pouvons dire si ces miARNs sont dans des vésicules (sécrétés) ou libres dans le plasma (excrétés) ni leur origine tissulaire. Une étude plus exhaustive sera nécessaire pour cela. De manière importante, l'altération de leur taux dans la circulation sanguine ouvre la possibilité de les envisager comme de potentiels bio-marqueurs prédictifs. Avant d'envisager une telle utilisation, il nous a paru important de tester si ce miARN était retrouvé chez l'Homme et si ses taux circulants étaient altérés en cas de syndrome métabolique.

**Etude des profils de miARNs dans le liquide séminal
de patients infertiles avec un surpoids ou une
obésité associé(e) à un syndrome métabolique**

Contexte :

Le surpoids et l'obésité, respectivement défini par un indice de masse corporelle (IMC) égal ou supérieur à 25 et égal ou supérieur à 30, sont devenus des enjeux majeurs de notre société. Selon les indications de l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2016 le surpoids touchait 39% des adultes dans le Monde et l'obésité 13%. L'altération de la distribution de la masse grasse a un impact sur le développement des co-morbidités liées à l'obésité, et l'obésité abdominale est notamment l'un des critères les plus importants définissant le syndrome métabolique (Grundy *et al.* 2004). Des études sur de grandes cohortes ont mis en évidence un lien entre surpoids ou obésité et une augmentation du risque d'infertilité chez les femmes et les hommes (Ramlau-Hansen *et al.* 2007). En effet, il a été montré chez les hommes une augmentation de risque d'oligospermie ou azoospermie en cas de surpoids ou d'obésité (Sermondade *et al.* 2012). Cependant, l'association entre le syndrome métabolique et la fonction reproductrice masculine a pour l'instant été peu étudiée. Un impact négatif du syndrome métabolique est suspecté bien que les données soient peu nombreuses et controversées (Morrison and Brannigan 2015; Ventimiglia *et al.* 2016).

De plus, même en cas de reproduction réussie, de nombreuses données s'accumulent pour indiquer qu'une obésité parentale (incluant le mâle) influencerait la susceptibilité de sa descendance à développer des pathologies ultérieures. Cette notion dérive du concept de DOHaD qui implique une programmation de la santé d'un individu liée à un environnement défavorable. Elle a été étendue à un environnement pré-conceptuel qui, s'il est défavorable, pourrait lui aussi modifier et altérer la qualité des gamètes, en particulier certaines marques épigénétiques, et donc contribuer à une altération des compétences développementales et de la santé du futur embryon. Cette altération pourrait ainsi également jouer un rôle critique dans la santé à long terme des individus. Pour le moment, l'environnement maternel a été plus étudié (Gabory *et al.* 2016). L'impact du surpoids et de l'obésité de l'homme sur la santé des descendants a fait l'objet d'un intérêt récent qui est encore peu développé pour le moment. Il existe cependant quelques données objectivant un effet du poids paternel sur le développement des descendants. En effet, dans un modèle murin, il a été montré que l'obésité paternelle induite par un régime hyperlipidique entraînait chez les descendants mâles et femelles une résistance à l'insuline

et une obésité à plus long terme. Les miARNs sont aussi des régulateurs importants de la spermatogenèse (Hayashi *et al.* 2008) et le liquide séminal est l'un des fluides les plus diversifiés en miARNs (Weber *et al.* 2010). De manière intéressante, dans ce modèle d'obésité paternelle, le contenu en miARNs des spermatozoïdes produits par les souris obèses était altéré (Fullston *et al.* 2013). De manière importante, il a également été montré que l'inoculation *in vitro* d'un miARN dans un œuf fécondé pouvait induire une insulino-résistance et une obésité à l'âge adulte (Grandjean *et al.* 2015).

Objectif :

Cette étude a été initiée par le Pr R Lévy et le Dr C Dupont qui portent un intérêt tout particulier aux différents liens entre reproduction et syndrome métabolique. Elles sont principalement intéressées par déterminer un profil de miARN dans le plasma séminal et le plasma sanguin en fonction du profil métabolique des hommes infertiles et d'isoler de potentiels bio-marqueurs de la fertilité et de chance de grossesse spontanée ou de succès suite à une assistance médicale à la procréation (AMP) en cas de désordre métabolique.

Dans cette collaboration, notre objectif particulier était d'étudier si les miARNs isolés dans notre modèle de souris RCIU, les miR-19a-3p et miR-19b-3p, pouvaient être retrouvés chez l'Homme et s'ils présentaient des taux altérés en cas de syndrome métabolique. En attendant d'avoir accès au plasma sanguin, une étude préliminaire a été réalisée à partir de plasma séminal, permettant ainsi d'évaluer la faisabilité du projet et donner des premières indications.

Matériels & Méthodes :

Sujets : 145 hommes partenaires de couples infertiles ont été recrutés dans l'un des trois centres participant à l'étude METASPERME (AOM10020) : CHU Jean Verdier – CHU Bichat – CHU Tenon.

Les critères d'inclusions :

microARN	Séquence	Cat
hsa-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	479241_mir
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	478494_mir
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA	479228_mir
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	478264_mir
hsa-miR-34b-3p	CAAUCACUAACUCCACUGCCAU	478049_mir
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	478052_mir
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	477855_mir
hsa-miR-133b-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA	480871_mir
hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	477937_mir
hsa-miR-340-5p	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU	478042_mir
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	478577_mir
mmu-miR-195a-5p	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	mmu482953_mir

Tableau 6 : Sondes pour les PCR en temps réel de microARN des extraits de plasmas séminaux.

- Homme âgé de 18 à 45 ans (en âge de procréer)
- Homme consultant pour une infertilité primaire ou secondaire du couple (incapacité du couple à concevoir un enfant après 12 mois de rapports sexuels non protégés), avec ou sans notion de paternité antérieure
- Patient affilié à un régime de sécurité sociale
- Patient ayant eu une consultation médicale préalable
- Patient ayant donné son consentement éclairé et écrit pour participer à l'étude

Les critères de non inclusion :

- Patient présentant des difficultés de compréhension de la langue française
- Patient fumant plus de 2 paquets de cigarettes par jour
- Patient pris en charge dans le cadre d'un risque viral (virus de l'immunodéficience humaine VIH, hépatite B (VHB), hépatite C (VHC))
- Homme partenaire d'un couple infertile en âge de procréer, présentant une infertilité non idiopathique, c'est-à-dire pouvant être expliquée de façon certaine par un ou plusieurs des facteurs suivants : facteurs identifiables lors de l'interrogatoire associé au premier spermogramme (toxiques, infectieux, anatomiques) ou identifiés à l'issue du bilan étiologique complémentaire réalisé hors cadre du PHRC (facteurs cytogénétiques ou géniques)

Lors de la visite d'inclusion, un recueil de données a été fait à l'aide de questionnaires validés et différentes mesures ont été effectuées (incluant l'IMC, le tour de taille etc.) et des examens ont été réalisés incluant une prise de sang, un recueil de sperme et des analyses génétiques (spermatozoïdes).

Parmi les paramètres, les hommes ont été classés selon s'ils présentaient ou non un syndrome métabolique. Le syndrome métabolique a été diagnostiqué si le sujet présentait au moins trois des critères suivants : tour de taille > 92cm, triglycérides \geq 150mg/dL soit 1,7mmol/L, cholestérol HDL < 40mg/dL soit 1,0mmol/L, glycémie à jeun \geq 100mg/dL soit 5,6mmol/L, pression artérielle \geq 130/ \geq 85mmHg (Alberti *et al.* 2009).

Extraction des miARNs et RT-qPCR : Les spermatozoïdes collectés ont été centrifugés puis le plasma séminal a été récupéré et stocké à -80°C. Les miARNs ont été extraits à l'aide du kit

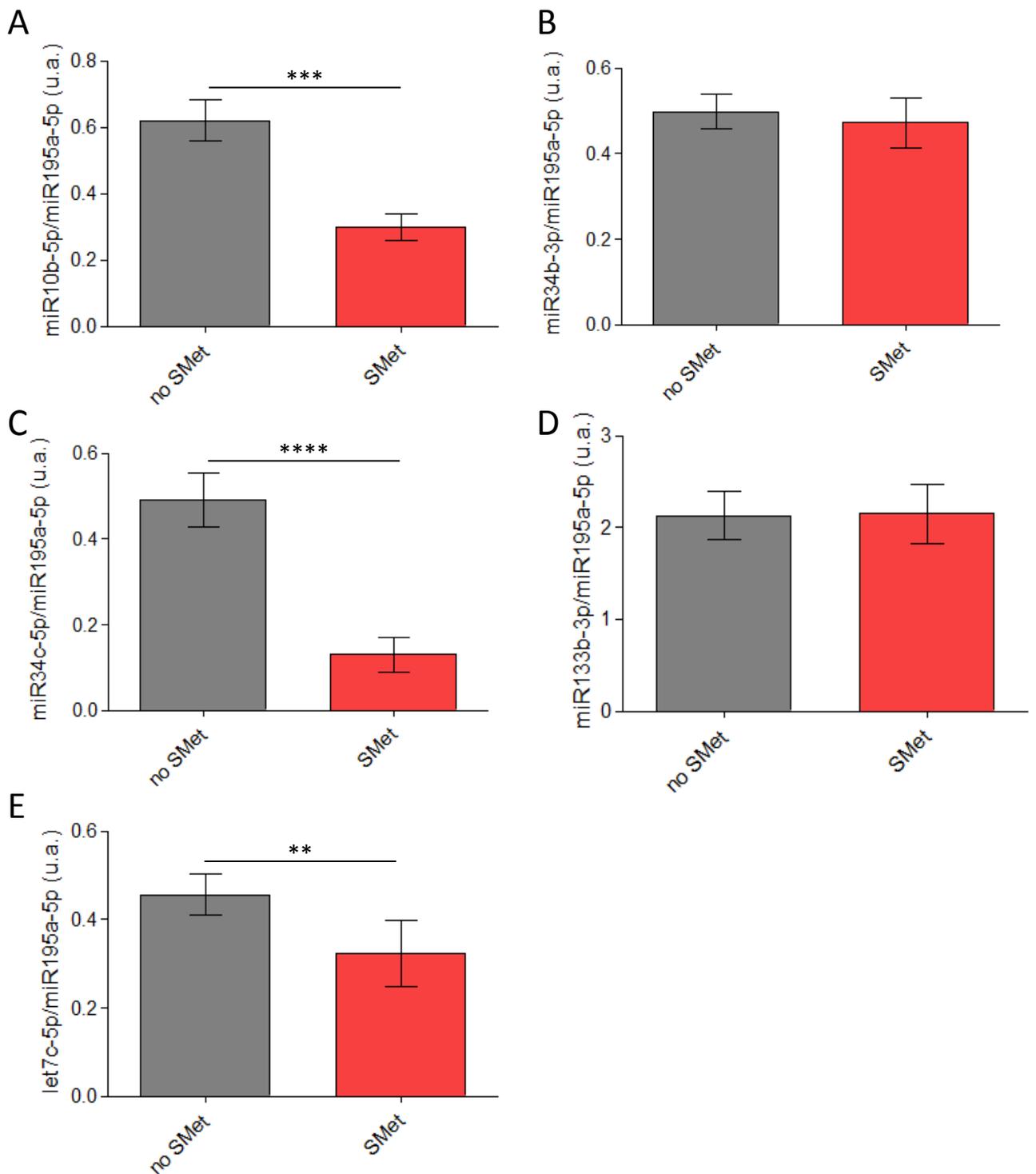


Figure 22: Impact du syndrome métabolique sur l'expression de différents microARNs dans le plasma séminal. Expression des miR-10b-5p (A), miR-34b-3p (B), miR-34c-5p (C), miR-133b-3p (D) et let-7c-5p (E) dans la plasma séminal d'hommes atteints de syndrome métabolique (SMet) ou non (no SMet). Les expressions relatives par rapport au miR-195a-5p sont présentées en unités arbitraires (u.a.). Moyenne \pm SEM, n=90/38 respectivement pour le groupe no SMet/SMet. Statistique : Student test avec ***=p<0.01.

Nucleospin miRNA Plasma (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant. Les expériences de RT-qPCR (*TaqMan advanced miRNA assays*, Thermofisher) ont été réalisées avec les sondes présentées dans le **Tableau 6**. Les niveaux d'expression bruts ont été mesurés par rapport à une gamme standard puis normalisés par le mmu-miR-195a-5p (contrôle endogène stable, (Fullston *et al.* 2013)). Les qPCR ont été effectuées avec le thermocycler Applied Biosystems StepOnePlus.

Analyses statistiques : Les résultats sont présentés avec la moyenne \pm SEM. La comparaison entre les deux groupes a été réalisée par un test de Mann Whitney. Les différences significatives sont représentées par des astérisques, avec ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Résultats :

Les différents miARNs ont été choisis en fonction des études en cours dans les deux équipes et grâce à la littérature (Grandjean *et al.* 2015).

Parmi les 11 miARNs testés, aucun signal n'a pu être obtenu pour 4 d'entre eux : miR-10a-5p, miR-122-5p, miR-183-5p et miR-340-5p suggérant une expression probablement absente ou trop faible.

Les résultats présentés ici sont des résultats préliminaires. En effet, les données obtenues dans l'étude Métasperme regroupent de très nombreux paramètres métaboliques tels que la présence d'un syndrome métabolique, l'indice de masse corporelle, le tour de taille, la cholestérolémie etc... et des paramètres concernant l'infertilité (nombre de spermatozoïdes mobiles etc...). Ainsi, les résultats que j'ai obtenus suite aux RT-qPCR pour les différents miARNs ont été confiés à des biostatisticiens afin qu'ils puissent corrélés ces résultats aux données Métasperme. Les analyses sont actuellement en cours.

En attendant les résultats des bioinformaticiens, nous avons interprété les données pour la variable « Syndrome métabolique » (SMet, réponse : oui ou non) (**Figure 22**). Nous avons observé une diminution de la quantité des miR-10b-5p, miR-34c-5p et let-7c-5p dans le plasma séminal d'hommes atteints de syndrome métabolique. De manière très intéressante, miR-19a-3p était lui aussi diminué dans le plasma séminal des hommes atteints

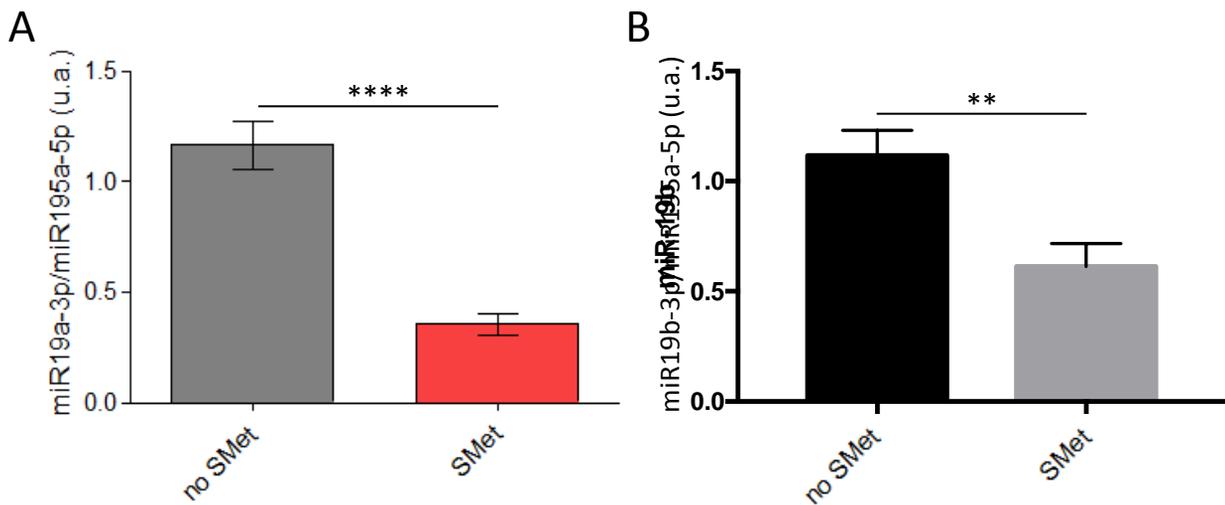


Figure 23: Impact du syndrome métabolique sur l'expression des miR-19a et miR-19b dans le plasma séminal. Expression des miR-19a (A) et miR-19b (B) dans la plasma séminal d'hommes atteints de syndrome métabolique (SMet) ou non (no SMet). Les expressions relatives par rapport au miR-195a sont présentées en unités arbitraires (u.a.). Moyenne \pm SEM, n=90/38 respectivement pour le groupe no SMet/SMet. Statistique : test de Mann Whitney, avec **= $p < 0.01$ et ****= $p < 0.0001$.

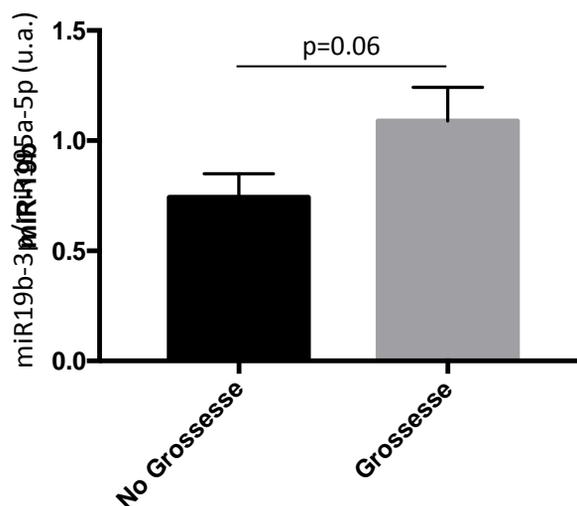


Figure 24: Expression du miR-19b dans le plasma séminal d'homme ayant eu une AMP. Expression du miR-19b dans la plasma séminal d'hommes dont la femme a eu une grossesse post AMP (grossesse) ou non (no grossesse). L'expression relative par rapport au miR-195a est présentée en unités arbitraires (u.a.). Moyenne \pm SEM, n=71/66 respectivement pour le groupe no Grossesse/Grossesse. Statistique : test de Mann Whitney.

de syndrome métabolique. Les biostatisticiens ont fait cette même observation pour le miR-19b-3p (**Figure 23**).

Les résultats préliminaires et non publiés de l'étude Métasperme ont mis en évidence que le syndrome métabolique entraînait une diminution de chance d'avoir une grossesse par AMP. En effet, dans cette étude, 40% des pères étaient atteints de syndrome métabolique en cas d'échec de grossesse post-AMP alors qu'il y avait 26% d'hommes atteints de syndrome métabolique lors de succès. Ainsi, l'équipe de R. Lévy s'attèle à rechercher d'autres facteurs permettant de prédire le taux de succès ou échec de l'AMP. En ce sens, les biostatisticiens ont recherché s'il y avait des miARNs dont l'expression pouvait être modifiée selon s'il y avait eu une grossesse post-AMP ou non. Ils ont ainsi pu observer une augmentation non significative ($p=0.06$) de la quantité de miR-19b-3p dans le plasma séminal d'hommes dont l'AMP avait été réussie pour leur partenaire (**Figure 24**).

Conclusion :

Les résultats préliminaires indiquent une altération de la quantité de plusieurs miARNs dans le plasma séminal d'hommes atteints d'un syndrome métabolique et notamment de miR-19a-3p et miR-19b-3p. L'étude Métasperme a initialement été réalisée afin de trouver des bio-marqueurs corrélés aux taux de réussite de l'AMP. Pour le moment, le miR-19b-3p pourrait être un bon candidat. En effet, il semble diminué, de manière non significative, chez les hommes dont la partenaire a eu une grossesse post-AMP. Cette corrélation entre le miR-19b-3p et le taux de réussite de grossesse après AMP pourrait être associée au fait que l'expression de ce miARN était significativement diminuée chez les patients atteints du syndrome métabolique par rapport aux patients sains. La prochaine étape serait de construire un modèle de prédiction de réussite de grossesse post-AMP selon des critères déjà connus (diminution du taux de testostérone par exemple) et d'y ajouter le miR-19b-3p afin de savoir si ce critère pourrait améliorer le modèle.

D'autre part, il serait très intéressant de corréler l'expression du miR-19a-3p avec d'autres paramètres métaboliques disponibles tels que l'IMC ou l'insulinémie afin de voir s'il

pourrait être un reflet de l'un de ces paramètres. En effet, dans ma première étude, j'ai pu montrer que ce miARN était altéré dans le foie des souris RCIU-S qui développaient une obésité à l'âge de 3 mois, une résistance à l'insuline et une hypertension artérielle à 18 mois (qui entre dans les critères d'appartenance au syndrome métabolique défini chez l'homme), et les résultats obtenus ici semblent cohérents avec cette étude. D'autre part, j'ai pu également observer que le miR-19a-3p était diminué dans le plasma sanguin des souris nées avec un RCIU et normalement nourries ou sur-nourries durant la lactation ce qui suggère sa potentielle utilisation comme bio-marqueur circulant chez la souris. Un prélèvement de sang a été réalisé chez ces hommes, et il est prévu de quantifier l'expression de ce miARN dans le plasma sanguin afin de voir si ce dernier reflète les résultats observés pour le plasma séminal et si le mir-19a-3p pourrait également servir de bio-marqueur chez l'Homme. Si les résultats étaient positifs, nous pourrions alors envisager de quantifier le miR-19a-3p dans une cohorte plus importante d'hommes atteints de syndrome métabolique.

DISCUSSION

Durant ces dernières décennies, de nombreuses études ont mis en évidence que le RCIU est associé à long terme à un risque accru de développer des pathologies cardio-métaboliques. Il a été suggéré une origine développementale de ces pathologies qui impliquerait un mécanisme d'adaptation prédictive de l'organisme : le fœtus modulerait son développement afin d'adapter ses besoins ultérieurs à l'environnement dans lequel il estime qu'il évoluera. Dans le cas des pays développés où l'environnement est très riche, plus la déviation entre l'environnement anticipé et l'environnement réel est importante et précoce, et plus le risque de développer des pathologies s'accroît. Il est ainsi suggéré que l'émergence de ces pathologies pourrait être plus précoce et sévère en cas de rattrapage rapide de la croissance (Bateson *et al.* 2004; Gluckman and Hanson 2004; McMillen and Robinson 2005). Ceci met en évidence l'importance de la fenêtre périnatale dans la programmation des niveaux de régulation des organes. Des études portent actuellement sur la compréhension des mécanismes sous-jacents qui pourraient notamment impliquer des modifications du statut épigénétique durant la période périnatale.

Ainsi, durant ma thèse, je me suis attachée à tenter d'élucider des mécanismes associés au développement des pathologies métaboliques suite à un RCIU et l'impact de l'alimentation en période post-natale précoce. Pour cela, nous avons mis en place un modèle de souris nées avec un RCIU. Nous avons décidé d'induire le RCIU grâce à un régime hypoprotéique de la mère durant la troisième et dernière semaine de gestation afin de cibler plus spécifiquement l'IGF1, qui est sensible à la disponibilité en acides aminés. Afin de moduler la nutrition des souriceaux en période post-natale précoce, les portées de souriceaux ont été nivelées à 10, 6 ou 3 petits par mère afin d'induire, respectivement, une restriction alimentaire, une alimentation contrôlée ou une surnutrition durant la période de lactation.

Nous avons tout d'abord caractérisé ce modèle et avons confirmé que nous avons développé un modèle de RCIU, en vérifiant la présence d'une cassure dans la courbe de croissance des fœtus. Nous avons notamment observé que les fœtus présentaient un dimorphisme sexuel dès le stade fœtal et dont les effets persisteraient à l'âge adulte. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de comprendre les mécanismes sous-jacents.

Les mâles présentent ainsi une sensibilité plus forte aux modulations de la nutrition périnatale que les femelles. Chez les mâles, concernant le groupe RCIU restreint en période de lactation, nous avons pu observer qu'en absence de rattrapage de la croissance durant la lactation, les souris mâles ne développaient pas de complications aux âges observés. En effet, ils ne développent pas d'hypertension artérielle, d'obésité, d'accumulation de graisses dans le foie et restent sensibles à l'insuline même à l'âge de 12 mois. Ainsi, l'adéquation entre la nutrition durant la lactation et celle *in utero* semblerait éviter le développement de complications cardio-métaboliques. Cependant, chez l'humain, on recommande d'éviter toute restriction nutritionnelle post-natale afin de permettre un bon développement du cerveau. Nous n'avons pas réalisé de tests afin d'évaluer le développement cognitif dans notre modèle. Cependant, une étude récente portant sur l'impact d'un RCIU sur les capacités cognitives à l'âge adulte a été réalisée sur un modèle de souris nées avec un RCIU induit par une restriction calorique durant la dernière semaine de gestation (Duran Fernandez-Feijoo *et al.* 2017). A la naissance, les souriceaux ont été séparés en deux groupes : le premier groupe dans lequel la mère avait un accès libre à la nourriture et le second groupe dans lequel la mère était sous restriction calorique durant toute la période de lactation. Les auteurs ont observé que les souris nées avec un RCIU, maintenues sous restriction durant la lactation, présentaient des capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale altérées. Ces capacités étaient en revanche améliorées lorsque les souris nées avec un RCIU présentaient un rattrapage de la croissance grâce à la réalimentation de leur mère. Ainsi, en l'absence de réalimentation maternelle permettant un rattrapage de la croissance en période post-natale précoce, les enfants nés avec un RCIU auraient une probabilité beaucoup plus faible de développer des complications cardio-métaboliques mais présenteraient vraisemblablement une altération de leur développement cognitif.

D'autre part, il serait aussi intéressant d'étudier l'immunité chez ces souris. En effet, lors du vieillissement de ces souris pour l'étude de leur tension artérielle à 18 mois, j'ai pu observer une certaine fragilité particulière de ce groupe. En ce sens, des études ont été réalisées par d'autres équipes chez des nouveau-nés nés avec un RCIU ou un PAG et ont montré une diminution du nombre total de lymphocytes T et de lymphocytes B ainsi qu'une diminution du volume du thymus (Longo *et al.* 2014). Une étude a notamment montré qu'à la naissance, le nombre de lymphocytes T était réduit chez les enfants nés avec un RCIU et

qu'ils avaient une réponse diminuée au test cutané d'hypersensibilité retardée. A l'âge de 5 ans, les enfants nés avec un RCIU ne présentaient plus d'altération du nombre de lymphocytes T mais avaient toujours une réponse altérée au test d'hypersensibilité retardée. Le système immunitaire semble donc être encore altéré après la naissance (Ferguson 1978). Cependant peu d'études ont été réalisées à un âge plus avancé afin de savoir si des altérations du système immunitaire persistent. Il serait envisageable que le système immunitaire de nos souris nées avec un RCIU soit immature et qu'il le reste avec la restriction durant la lactation. Ainsi ce groupe de souris serait plus susceptible aux infections. Concernant les groupes présentant un rattrapage de la croissance du à une réalimentation de la mère en période de lactation (RCIU-N et RCIU-S), nous pourrions penser que le nombre de lymphocytes revienne à l'identique de celui des souris contrôles mais que ces souris pourraient tout de même être plus sensibles au développement d'une infection. Il serait donc intéressant de quantifier et étudier le phénotype ainsi que l'activité des différentes populations lymphocytaires à l'âge adulte ainsi que la régulation de la réponse inflammatoire.

En cas de rattrapage de la croissance durant la lactation, nous avons pu observer que les souris mâles développent une hypertension artérielle, une obésité, une résistance à l'insuline ainsi qu'une accumulation de lipides dans leur foie. De manière cohérente, plus le rattrapage a lieu rapidement, plus les souris développent des complications métaboliques précoces. En effet, en cas de surnutrition durant la période de lactation, les souris nées avec un RCIU développent rapidement un gain de poids plus important et sont moins sensibles à l'insuline que les souris contrôles à l'âge de trois mois. Les souris nées avec un RCIU et normalement nourries durant la lactation, en accord avec l'hypothèse du DOHaD, développent des complications cardio-métaboliques de manière retardée. Ainsi, nous avons privilégié ce groupe pour effectuer notre ChIP-Seq afin d'étudier si les mécanismes épigénétiques pouvaient être altérés avant l'observation de la pathologie dans le but de mettre en évidence des modifications liées à la programmation des pathologies. Nous avons décidé d'étudier la marque H3K4me3, marque associée à la stimulation de la transcription des gènes et retrouvée au niveau du promoteur des gènes et du 1^{er} exon. Cette marque a été souvent étudiée et sa cartographie dans le génome est donc bien connue. De plus, les

marques positives sont assez bien corrélées avec les niveaux d'expression (ARNm). Par la suite, il serait bien entendu très intéressant de regarder l'expression d'autres marques d'histones tels que la tri-méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) ou la mono-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me1) qui sont également bien corrélées avec la transcription des ARNm (Barski *et al.* 2007). Nous pourrions notamment regarder une marque associée à la répression de la transcription telle que H3K27me3 (triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3), dont le niveau au niveau du gène reflète son expression globale (Barski *et al.* 2007; Gabory *et al.* 2011). D'autre part, nous pourrions également étudier les profils de méthylation des gènes mis en évidence dans le CHIP-Seq. Les résultats de notre CHIP-Seq ont mis en évidence une altération de la marque H3K4me3 sur 262 gènes impliqués dans différentes voies de régulations. Parmi ceux-ci, nous avons décidé de nous concentrer sur la voie de signalisation de l'insuline. En effet, nous avons pu observer qu'à l'âge de 3 mois, nos souris ne présentaient pas d'altération de la sensibilité à l'insuline lors du test malgré une diminution de la phosphorylation hépatique d'AKT au niveau moléculaire. Ainsi, le CHIP-Seq a permis de mettre en évidence une diminution de la marque H3K4me3 du gène *Akt* dans le foie des souris RCIU-N, qui s'est reflétée aussi bien au niveau de l'ARNm que protéique. Cette diminution pourrait renforcer une altération de la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique. De manière intéressante, nous avons pu observer que ces dérégulations d'AKT semblaient s'accompagner d'une altération de la régulation post-transcriptionnelle de PTEN, son inhibiteur. En effet, lors du CHIP-Seq, nous avons pu observer des altérations épigénétiques au niveau de gènes impliqués dans la maturation des miARNs (*Dicer*) et d'un cluster de miARN. De manière intéressante, nous avons pu observer une diminution du miR-19a-3p dans le foie des souris RCIU sur-nourries et une tendance chez les souris RCIU normalement nourries. Ce miARN est généré à partir du cluster pri-miR17-92, soumis à une régulation épigénétique, et l'une de ses nombreuses cibles est PTEN. Ainsi, par la suite, nous souhaiterions confirmer le rôle direct du miR-19a-3p sur la régulation de PTEN dans notre modèle à l'aide de culture primaire d'hépatocytes. En effet, ce rôle a été récemment validé dans des modèles de lignées cellulaires (Feng *et al.* 2014; Qian *et al.* 2018) et nécessite d'être confirmé dans des cultures primaires. Si nous confirmons ces résultats, il serait intéressant par la suite d'injecter un mimic du miR-19a-3p directement dans notre modèle de souris nées avec un RCIU et sur-nourries durant la lactation, qui sont les premières à présenter une diminution de la sensibilité à l'insuline, afin d'évaluer leur potentiel à

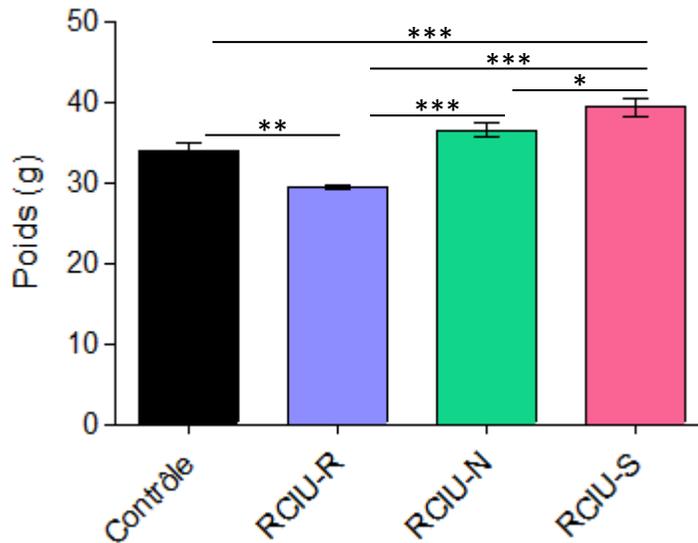


Figure 25 : Poids à 18 mois des souris RCIU femelles en fonction de la nutrition périnatale. Le poids corporel à l'âge de 18 mois des différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne ± SEM, n=6-8 par groupe. Statistique : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls, *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001.

récupérer un niveau de phosphorylation d'AKT similaire à celui des souris contrôles. Durant cette dernière décennie, avec l'essor des miARNs, les tentatives de sauvetages à l'aide de miARN sont de plus en plus étudiées. Ainsi, différents moyens sont à l'heure actuelle utilisés pour injecter ces miARNs (vecteurs viraux, liposomes...) (Merhautova *et al.* 2016). Parmi ceux-ci, nous privilégierons l'utilisation d'un vecteur viral contenant notre mimic que nous injecterions par la veine caudale chez nos souris. D'autre part, des études ont montré des effets plus prononcés lors de l'utilisation simultanée de deux miARNs (Megiorni *et al.* 2011; Kasinski *et al.* 2015). De manière intéressante, nous avons trouvé que le miR-19b-3p, qui provient aussi du pri-miR17-92, était lui aussi diminué dans le foie de nos souris nées avec un RCIU et sur-nourries ou normalement nourries durant la lactation. Il serait donc intéressant d'évaluer la combinaison de ces deux miARNs sur la régulation de PTEN dans nos cultures d'hépatocytes primaires.

Concernant les femelles, nous avons pu observer que les femelles nées avec un RCIU n'avaient aucune altération de leur sensibilité à l'insuline à l'âge de 3 mois. A 12 mois, seules les femelles nées avec un RCIU et sur-nourries durant la lactation semblent devenir moins sensibles à l'insuline. Ce dimorphisme sexuel avait déjà été retrouvé dans un modèle de rat né avec un RCIU pour lequel les mâles présentaient une résistance à l'insuline à 110 jours qui n'étaient pas retrouvée chez les femelles (Sugden and Holness 2002). Il a été émis l'hypothèse que la réponse sexe-spécifique à une restriction nutritionnelle *in utero* pourrait être due à une sensibilité plus grande des mâles à l'alimentation du fait de la croissance plus rapide de leurs tissus et donc de besoins nutritionnels plus critiques (Lucas *et al.* 1996), et une adaptabilité fonctionnelle du placenta des fœtus femelles plus importante. Nous avons sacrifié nos souris femelles à l'âge de 18 mois et avons pu observer que les souris nées avec un RCIU et sur-nourries étaient plus grosses que les souris contrôles et que les souris nées avec un RCIU et normalement nourries durant la lactation présentaient une tendance similaire à avoir un poids plus important (**Figure 25**). Ainsi, les femelles semblent développer les pathologies plus tardivement que les mâles. Nous avons prélevé le foie de ces souris et par la suite nous souhaiterions évaluer la présence d'une stéatose. La mise en évidence d'altérations chez les souris RCIU-N et RCIU-S nécessiterait probablement une stimulation métabolique par une alimentation riche en graisse par exemple. Le dimorphisme sexuel

observé lors de notre étude est en accord avec de nombreuses études montrant que les individus mâles sont plus sujets à développer des pathologies de manière précoce que les femelles (Aiken and Ozanne 2013). Cette différence pourrait impliquer aussi bien des mécanismes épigénétiques que les chromosomes sexuels (Gabory *et al.* 2011), cependant les mécanismes sont complexes et nécessitent de plus amples investigations.

Une autre fonction souvent associée au métabolisme énergétique est la fonction reproductrice. Aussi, nous avons décidé d'étudier les potentielles altérations de l'axe gonadotrope chez nos femelles nées avec un RCIU. Nous avons pu mettre en évidence dans notre modèle que l'alimentation durant la période de lactation avait un impact prépondérant sur la date d'ouverture vaginale de nos souris. De plus le changement de nutrition entre les périodes foetale et post-natale précoce modulait l'âge du premier œstrus. Ainsi, l'entrée en puberté chez nos souris semble impactée. Au niveau moléculaire, l'altération de l'expression de kisspeptine est modulée par la nutrition en période de lactation à 28 jours. L'expression mesurée ici est celle de Kisspeptine totale. L'activation de cet axe dépendrait notamment du Kisspeptine du noyau arqué et ainsi, une étude plus fine pourrait être intéressante. A l'âge adulte, nous avons pu observer un effet du rattrapage de la croissance chez nos souris nées avec un RCIU qui ont un cycle œstral plus court. Des analyses plus approfondies seront prochainement réalisées, portant notamment sur le nombre de follicules par ovaire, ce qui nous renseignera sur les capacités de reproduction à long terme. En effet, nous n'avons pas observé d'altération des capacités de reproduction à l'âge de 3 mois mais celles-ci pourraient s'altérer avec le temps avec un épuisement des follicules. Il serait aussi intéressant de regarder l'impact sur la descendance. En effet, une étude a notamment montré que les filles nées avec un PAG présentaient une diminution de la taille de leur utérus et de leurs ovaires à l'adolescence (Ibanez *et al.* 2000). Cette diminution de la taille de l'utérus pourrait potentiellement influencer la croissance foetale et réduire le poids de la descendance. Dans notre modèle, nous avons retrouvé une diminution du poids de l'utérus à 28 jours dans les groupes RCIU-R et RCIU-N et une tendance chez les souris RCIU-S. A l'âge adulte, les utérus ont été prélevés et pesés en période de pro-œstrus. Or, ils n'étaient donc pas en période de repos (di-œstrus), il serait intéressant de prélever les utérus durant cette période afin de savoir si la diminution du poids observée à 28 jours persiste. Par la suite, nous pourrions évaluer les conséquences dans la seconde génération et

ainsi déterminer l'impact sur le développement fœtal de la descendance de souris nées avec un RCIU. Parmi les mécanismes impliqués, il serait également intéressant d'étudier différentes marques épigénétiques qui pourraient être impliquées dans la programmation fœtale suite à une altération de l'environnement maternel. Par exemple, les gamètes femelles peuvent être sensibles aux perturbations épigénétiques pendant la maturation folliculaire qui se déroule, dans notre modèle murin, durant la lactation.

Dans le but d'étudier une modification de l'environnement maternel des souris nées avec un RCIU et leur réponse à une stimulation métabolique, une étude portée par le Dr Girardet a débuté dans le laboratoire afin d'étudier la prévalence du diabète gestationnel chez nos différents groupes de souris femelles. En effet, les souris femelles sembleraient protégées de complications métaboliques avant un âge avancé (12 mois). Cependant, leur capacité d'adaptation métabolique face à une situation de demande métabolique accrue reste à définir. La gestation pourrait constituer ce challenge métabolique. En effet, une insulino-résistance se met en place chez la mère afin de favoriser un flux massif de glucose vers le fœtus. Ceci impose aux cellules β pancréatiques de produire plus d'insuline, nécessitant ainsi une adaptation fonctionnelle (sécrétion accrue d'insuline) mais aussi cellulaire (masse de cellules β pancréatiques doublée). Lorsque la réponse adaptative des cellules β est compromise, il en résulte un diabète gestationnel. Cette étude est réalisée en collaboration avec le Dr Bertrand Blondeau qui a préalablement identifié un lien causal entre le RCIU et la capacité adaptative des cellules β au cours de la gestation (Blondeau *et al.* 1999; Blondeau *et al.* 2002). Ainsi l'objectif de ce projet est de déterminer le lien entre les conditions nutritionnelles en période post-natale précoce et le devenir métabolique chez les souris femelles RCIU au cours de la gestation. Cette étude sera réalisée chez des femelles primipares à l'âge de 4 mois mais aussi chez des femelles multipares à l'âge de 8 mois afin de déterminer les effets du nombre de gestation avec l'âge. Ces résultats donneront aussi certains éléments sur une potentielle altération de l'environnement utérin et donc un risque de transmissibilité à la génération suivante.

Dans notre modèle de souris, nous avons pu observer, chez les mâles, que la diminution des miR-19a-3p et miR-19b-3p, observée au niveau hépatique, était retrouvée

dans le plasma des souris mâles nées avec un RCIU et sur-nourries ou normalement nourries durant la lactation. Ces données sont en accord avec les études sur l'excrétion des miARNs et leur potentiel rôle de bio-marqueur sanguin (Chen *et al.* 2008). Ainsi, nous pourrions émettre l'hypothèse que ces microARNs pourraient servir de bio-marqueurs d'une diminution de la sensibilité à l'insuline et potentiellement prédire le développement d'un syndrome métabolique. Nous avons eu l'opportunité de pouvoir quantifier ce miARN dans le plasma séminal d'une cohorte de patients présentant un syndrome métabolique afin de voir si ces miARNs pouvaient être retrouvés chez l'Homme. De manière très intéressante, ces deux miARNs sont diminués dans le plasma séminal d'hommes atteints de syndrome métabolique. Parmi les paramètres de cette cohorte, il serait intéressant de savoir s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression dans le plasma séminal de ces miARNs et la présence d'un diabète. Nous avons accès à d'autres paramètres dans cette cohorte tels que l'insulinémie ou la glycémie à jeun. Il serait également intéressant d'établir des corrélations entre le niveau d'expression des miARNs et ces paramètres afin de connaître leur puissance en tant que bio-marqueurs. Des dosages dans le plasma sanguin seront réalisés prochainement et permettront d'étudier les corrélations entre les taux de miARNs sanguins et les paramètres métaboliques. Si des corrélations apparaissent, nous pourrions étudier ces miARNs dans le plasma de cohortes plus larges et à un âge plus précoce telles que la cohorte EDEN ou la cohorte d'Haguenau composée d'individus nés avec un PAG afin d'évaluer le caractère potentiellement prédictif.

Le rôle de ces miARNs dans le plasma séminal n'est pas bien compris mais pourrait être impliqué dans la transmission intergénérationnelle. En effet, des études ont mis en évidence une transmission intergénérationnelle de complications métaboliques. Par exemple, Jimenez-Chillaron et ses collègues ont étudié les complications métaboliques dans la seconde génération de souris nées de la descendance de mère sous régime hypocalorique durant la dernière semaine de gestation. Les auteurs ont montré que la transmission était aussi bien maternelle que paternelle (Jimenez-Chillaron *et al.* 2009). Les altérations dues à un environnement altéré au cours de la période fœtale de la 1^{ère} génération pourraient impliquer des marques épigénétiques et être potentiellement transmises en cas de modifications épigénétiques dans la lignée germinale. Il a été montré dans des modèles de souris maintenues sous régime riche en graisses que les complications métaboliques étaient

conservées dans la 2nde génération et pouvaient notamment être transmises *via* les ARNst (*tsRNAs*, *tRNA-derived small RNAs*) (Chen *et al.* 2016). De manière très intéressante, une étude chez l'humain a montré que la transmission de l'obésité était associée à une altération du profil de miARN dans le sperme de ces individus (Fullston *et al.* 2013). En outre, une étude sur un modèle murin a montré que l'inoculation d'un miARN, qui était augmenté dans le sperme des souris maintenues sous régime enrichi en graisses, dans un œuf fécondé (stade 1 cellule) suffisait à induire des altérations métaboliques dans la descendance à l'âge adulte (Grandjean *et al.* 2015).

Afin de renforcer la puissance prédictive des miARNs comme bio-marqueurs, si elle est confirmée, d'autres éléments circulants pourraient être ajoutés afin d'obtenir un panel plus solide. Comme mentionné dans la partie Résultats, les souris adultes RCIU-N et RCIU-S développent rapidement une stéatose hépatique. De plus, les souris RCIU-N semblent également présenter une altération du métabolisme lipidique selon nos résultats de ChIP-Seq. Ainsi, les profils sanguins des lipides pourraient potentiellement compléter notre panel de bio-marqueurs et nous permettre de mettre en évidence des signatures lipidomiques spécifiques. En ce sens, une étude récente réalisée sur un modèle de restriction protéique chez le rat durant la période gestationnelle et/ou la lactation a permis de mettre en évidence des bio-marqueurs impliqués dans la sensibilité à l'insuline, présents tout au long de la vie, et pouvant interagir avec la nutrition en période de gestation. Ainsi, il a été mis en évidence que la descendance de mère sous régime hypo-protéique ou soumis à un changement nutritionnel entre la gestation et la lactation présentait des signatures métaboliques et lipidomiques bien spécifiques (Martin Agnoux *et al.* 2018). L'étude a notamment permis de montrer un impact durable de la restriction protéique maternelle durant la période périnatale sur le transcriptome hépatique et le lipodome chez la descendance mâle. Si le RCIU est suivi d'un *catch up growth*, le métabolisme des acides gras semble d'autant plus impacté. A l'inverse, la restriction protéique de la mère durant la lactation améliorerait l'utilisation de lipides et de carbohydrates chez la descendance mais impacterait tout de même le profil lipidomique hépatique des souriceaux. L'étude a démontré que le régime maternel pauvre en protéines durant toute la période périnatale serait associé à des signatures métaboliques sanguines et lipidomiques hépatiques chez

la descendance qui sont comparables à celles observées chez les descendants des mères témoins. Au contraire, un changement de nutrition maternelle entre la gestation et la lactation produirait des signatures métaboliques spécifiques, différant entre les petits nés avec un RCIU présentant un rattrapage de leur croissance, et ceux nés de mères témoins mais allaités par des mères sous alimentées en lactation. Ces résultats soutiennent l'idée que le lait fourni par les mères restreintes durant la lactation entraîne des changements métaboliques durables chez la descendance qui peuvent avoir un impact aussi important qu'une restriction durant la gestation. De manière générale, lors de cette étude, l'équipe a mis en évidence un phénotype métabolomique/lipidomique de la descendance de rats issus de mère sous restriction protéique en période périnatale similaire à celui de la descendance de rattes sous régime standard. En revanche, un *switch* entre une restriction protéique foetale et une alimentation normale en période post-natale précoce pourrait nettement aggraver les troubles.

Ainsi durant ma thèse, j'ai mis en place un modèle de RCIU afin d'étudier les effets de l'alimentation durant la période post-natale précoce sur la programmation des pathologies métaboliques à l'âge adulte et les mécanismes épigénétiques potentiellement impliqués au niveau hépatique. Nous avons pu observer un développement de ces pathologies préférentiellement chez les mâles qui pourraient impliquer des miARNs en plus de modifications post-traductionnelles d'histones. De manière intéressante, nos données suggèrent que certains miARNs pourraient être envisagés comme de potentiels biomarqueurs d'une altération métabolique. Ces données devront néanmoins être confortées et consolidées dans des cohortes humaines.

ANNEXE

**Etude de l'impact de différents régimes
en période de lactation sur le développement de
l'axe gonadotrope chez
des souris femelles nées avec un RCIU**

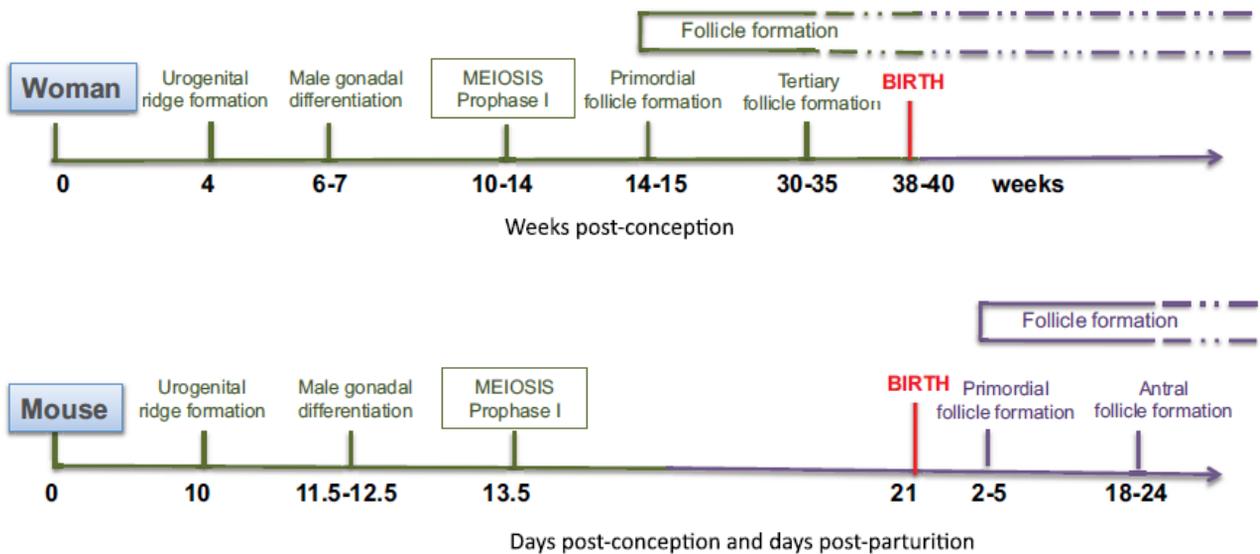


Figure 26: Représentation schématique du moment de la différenciation ovarienne chez la femme et la souris. La méiose intervient avant la naissance dans les deux espèces mais chez la souris, la folliculogénèse commence après la naissance. D'après Dupont, C *et al*, 2012.

Contexte :

Comme indiqué dans l'introduction de cette thèse, la nutrition en période périnatale joue un rôle essentiel dans la croissance et le développement post-natal et une altération dans cette période peut programmer l'apparition de pathologies à l'âge adulte, notamment de type cardio-métabolique. De plus, comme suggéré avec l'étude sur le protocole Métasperme du Pr R. Levy, le métabolisme a un rôle important dans la fonction reproductrice adulte. En effet, la fonction reproductrice est très intriquée avec le métabolisme et une altération de ce dernier peut modifier la capacité reproductrice.

Dans le contexte du DOHaD et de l'hypothèse de réponse d'adaptation prédictive, il est également possible que la mise en place des éléments contrôlant cette fonction soit altérée altérant ainsi la capacité reproductive et/ou la puberté. En ce sens, il a été montré chez l'humain que le début de la puberté et l'âge de la ménarche étaient avancées chez les filles nées avec un PAG comparées à des filles nées avec un poids approprié pour leur âge. Ces filles présentaient également des concentrations de FSH plus élevées et des ovaires et un utérus plus petits. De plus, à la puberté, elles avaient une prévalence de l'anovulation plus élevée et parmi celles qui étaient en ovulation leur taux d'ovulation était réduit (Ibanez *et al.* 2002; Dupont *et al.* 2012). Enfin, une étude réalisée sur 4 nouveau-nés a montré que les nouveau-nés nés avec un RCIU sévère présentaient un développement ovarien anormal, caractérisé par une diminution du volume des follicules primordiaux dans le cortex de l'ovaire (de Bruin *et al.* 1998). En effet, chez la femme, la folliculogénèse, l'étape de méiose et la formation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, qui gouverne la régulation de la fertilité et le début de la puberté, se développent durant la période fœtale (**Figure 26**) (Dupont *et al.* 2012). Chez les rongeurs, la période de développement est sensiblement différente. En effet, la formation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et l'étape de la méiose se déroulent également durant la période fœtale mais la folliculogénèse se déroule en période post-natale précoce. Une étude chez le rat a pu associer une restriction calorique durant la période de lactation ou la période périnatale à un retard de la puberté chez la femelle (Leonhardt *et al.* 2003).

En plus d'une atteinte au niveau des gonades, une altération au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique pourrait également avoir lieu. Brièvement, au niveau de

l'hypothalamus les neurones à GnRH stimulent la sécrétion de LH et de FSH par les cellules gonadotropes hypophysaires. La LH et la FSH agissent sur les gonades (ovaires ou testicules) afin de permettre la libération de stéroïdes sexuels (testostérone, œstrogène, progestérone). Ces derniers, via une modulation des neurones à kisspeptine hypothalamiques, régulent la sécrétion et la synthèse de GnRH (d'Anglemont de Tassigny and Colledge 2010). Ainsi, il a été rapporté que des altérations de la nutrition en période post-natale précoce, réalisées par un changement du nombre de souriceaux par portées, ont été associées à des défauts persistants d'innervation des neurones à GnRH par les neurones kisspeptinergiques (Caron *et al.* 2012).

Dans notre modèle de souris RCIU avec modification de la nutrition en période post-natale précoce, nous avons observé un fort dimorphisme sexuel. En effet, les femelles nées RCIU ne développaient pas de pathologies métaboliques à l'âge adulte de manière spontanée. Des différences pourraient néanmoins être sous-jacentes et nécessiter une exposition à un challenge métabolique tel que le régime riche en gras pour être notable. Étant donné les liens importants entre le métabolisme et la fonction reproductrice, une modification au niveau de cette dernière pourrait également être le reflet de ces altérations métaboliques sous-jacentes.

Objectif :

Les objectifs de cette étude étaient de connaître les impacts du changement de nutrition durant la période de lactation sur le développement de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique et la fonction reproductive chez les femelles de notre modèle de RCIU induit par régime hypo-protéique.

Matériels & Méthodes :

Animaux : Des souris femelles sauvages (*Wild Type*, WT) 129/SvPas ont été accouplées avec des mâles WT C57BL/6J (Charles River, l'Arbresle, France) afin d'obtenir une cohorte expérimentale sur un fond mixte, stable et contrôlé. Ce fond mixte a déjà été utilisé à

plusieurs reprises par l'équipe et sa dynamique de croissance est bien connue du laboratoire. Le RCIU a été induit par une alimentation *ad libitum* des femelles gestantes à partir du jour embryonnaire 15,5 (E_{15,5}), isocalorique et réduite de 40% en protéines (R05, Safe). A la naissance, les souriceaux sont adoptés par une mère receveuse, ayant mis bas le même jour, et ayant reçu une alimentation contrôle (A03, Safe) durant toute la gestation. Ceci permettait de contrôler l'alimentation des souriceaux sans le biais d'une re-nutrition de la mère en parallèle. Les modifications nutritionnelles des nouveau-nés ont été obtenues par un changement de la taille des portées. Ces modifications permettent de modifier l'apport nutritionnel durant la période de lactation (P1-P16) sans séparer les mères des petits, ce qui pourrait induire les effets indésirables d'un stress répété. La taille moyenne d'une portée de souris 129/SvPas dans notre animalerie est de 6 petits. Ainsi, les nouveau-nés RCIU ont été redistribués le jour de leur naissance, et les portées nivelées à 6 petits par mère (groupe normalement nourri, RCIU-N ou *IUGR-N*), à 3 petits par mère (groupe sur-nourri, RCIU-S ou *IUGR-O*) et 10 petits par mère (groupe restreint, RCIU-R ou *IUGR-R*). Ces 3 groupes ont été comparés à un groupe de souris Contrôles, normalement nourries durant la période de gestation et celle de lactation (6 souriceaux par mère après la naissance, Contrôle ou *Control*). Les souris sont nourries normalement après P16 (sevrage naturel) et séparées de leur mère à 28 jours de vie (P28). Durant toute l'expérience, les mères (gestantes et lactantes) et les souris de la cohorte expérimentale ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau, fournies *ad libitum*. Durant la période de lactation, les souris ont reçu l'alimentation contrôle (A03, Safe). Une semaine après le sevrage de la cohorte expérimentale, à l'âge de 28 jours, les souris ont reçu une nourriture de stabulation (Rod16, LASQCdiet). Cette étude porte seulement sur les souris femelles. Une partie de la cohorte a été sacrifiée à l'âge de 28 jours et une seconde à l'âge de 3 mois en période de pro-œstrus, sous anesthésie par isofluorane. Le sang a été récupéré sur EDTA par ponction cardiaque et le plasma récupéré par centrifugation (2000rpm, 15 minutes à 4°C). L'utérus, l'hypothalamus et les ovaires ont été prélevés et pesés. Les 2 derniers ont été congelés sur carboglace et stockés à -80°C, ou fixés au PFA 4%. Ce projet a été validé par le comité d'éthique Charles Darwin (n° d'agrément Ce5/2011/021).

Ouverture vaginale et cycle œstral : A partir du 20^{ème} jour de vie, l'ouverture vaginale a été vérifiée quotidiennement. Puis le cycle œstral a été contrôlé quotidiennement par un frottis

Gènes	Amorces Sens	Amorces Antisens
H3	CCAGAAATCGACTGAGCTGCTCAT	GCTGCACTTTGAAACCTCAAGTCG
GnRH1	CTGATGGCCGGCATTCTACT	ACATTCGAAGTGCTGGGGTT
Kiss1	ACAACTGGAACTCCTTCGGC	CTGCCTTGGCCTCTACAATCCAC
Kiss1R	AGCTGTTCTGGTGCTTCAA	GCAGAAGGCCTGTCTGAAGT

Tableau 7 : Listes des amorces pour les PCR en temps réel sur ADN complémentaire.

vaginal prélevé tous les matins au même moment pendant une dizaine de jours afin de déterminer la date du premier œstrus. Ces derniers ont été repris à l'âge de deux mois et demi afin de suivre au moins 3 cycles et permettre le sacrifice des souris en pro-œstrus. Les frottis ont été réalisés à partir de 20µL de sérum physiologique et suivis par une analyse histologique au crésyl violet. La durée du cycle œstral a été déterminée en calculant le nombre de jours entre deux œstrus.

Analyse de la capacité de reproduction : Cette analyse a été réalisée sur une 3^{ème} cohorte. A l'âge de 3 mois, les souris ont été mises en accouplement avec un mâle WT C57BL/6J (Charles River, l'Arbresle, France). Le délai d'obtention de la première portée a été calculé. Les souris ont été laissées en accouplement continu durant 105 jours et le nombre de portées ainsi que le nombre de petits par portée a été rapporté.

Coloration au crésyl violet : Les lames de frottis ont été séchées puis fixées à l'éthanol 100% pendant 10 minutes avant d'être colorées 1 minute dans du crésyl violet (MP Biochemicals, USA). Après un rinçage à l'eau, les lames ont été légèrement décolorées en éthanol 70% et acide acétique et déshydratées par des bains croissants d'éthanol puis de xylène et montées en milieu anhydre avant l'analyse au microscope.

Extraction des ARN et RT-qPCR : Les ARN de l'hypothalamus de souris âgées de 28 jours ont été extraits à l'aide du kit *Nucleospin RNAII* (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant. Les ADNc ont été synthétisés à partir de 500ng d'ARN totaux en présence d'amorces d'hexamères nucléotidiques aléatoires (dN6, 0.01µg/µL, Fermentas), de déoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs, 0.5mM Fermentas), d'inhibiteurs de RNases (RiboLock RNase inhibitor, 1U/µL, Fermentas), de la Reverse Transcriptase (RevertAidTM H Minus Reverse Transcriptase, 5U/µL, Fermentas) dans un tampon adéquat (MgCl₂ 3mM, Tris-HCL 50mM pH 8.3, DTT 5mM, KCl 75mM). L'expression des gènes a été mesurée par qPCR sur le thermocycleur SDS 7300. 4 µL d'ADNc ont été mis en présence du mix PCR avec Sybr Green et des amorces spécifiques (**Tableau 7**) dans un volume réactionnel final de 20µL. Les niveaux d'expression bruts ont été mesurés par rapport à une gamme standard puis normalisés par le gène de référence *H3*.

Analyses statistiques : Les résultats sont présentés comme la moyenne ± SEM. La comparaison entre les différents groupes a été réalisée par une *one-way* ANOVA suivie d'un

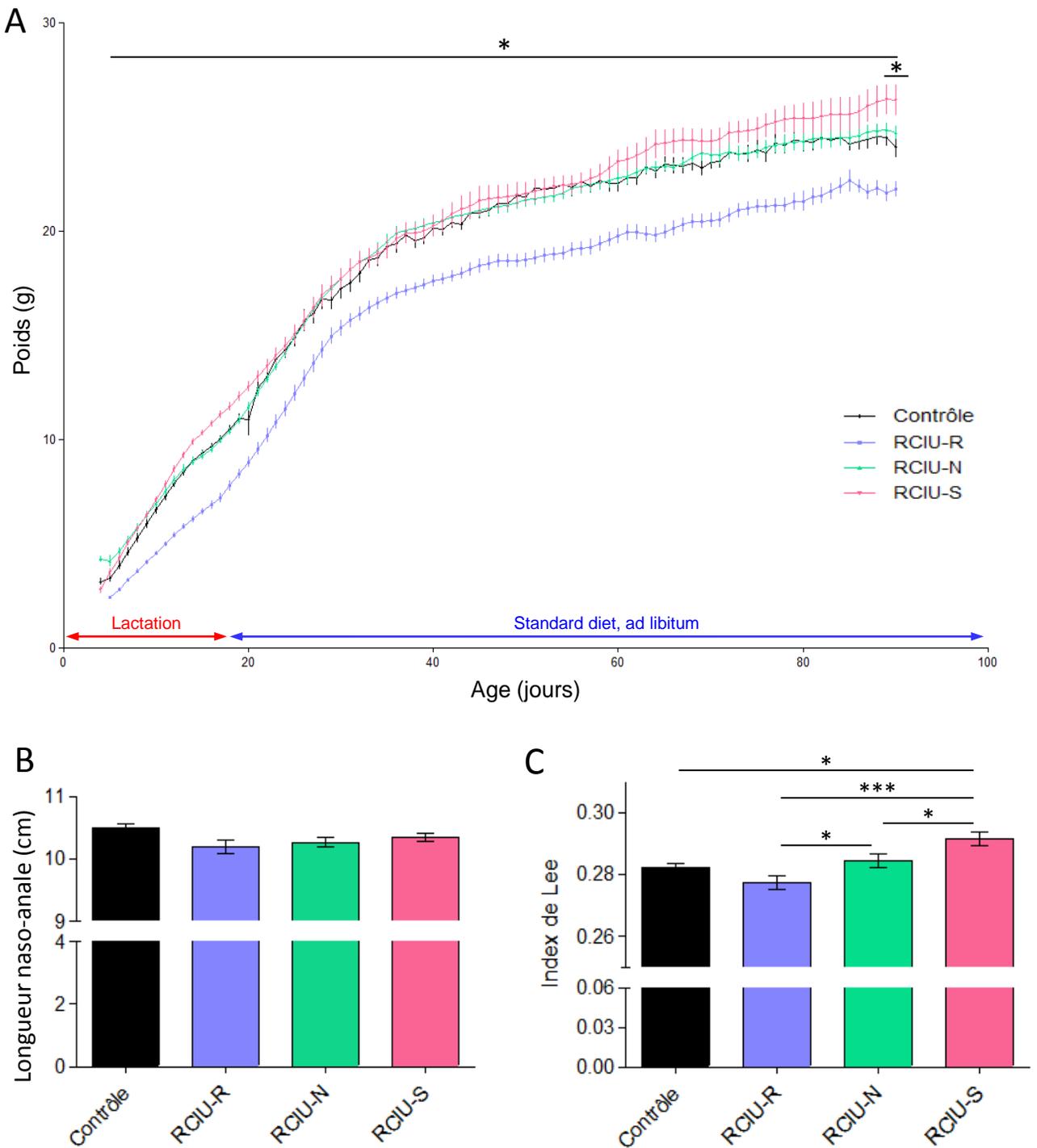


Figure 27: Courbes de croissances post-natales, taille et index de Lee à 3 mois chez des souris RCIU en fonction de la nutrition périnatale. Suite à un RCIU, la taille des portées est normalisée à 3 petits par mère pour une surnutrition (RCIU-S), 6 petits pour une alimentation normale (RCIU-N) et 10 petits pour une restriction alimentaire (RCIU-R). Le poids corporel est suivi 3 fois par semaine entre P5 et P90 (A), la taille (B) et l'index de Lee (C), indice de masse corporelle chez les rongeurs selon la formule $\frac{\sqrt[3]{\text{Poids Corporel}}}{\text{Taille Naso-anale}}$, sont calculés à l'âge de 3 mois. Moyenne \pm SEM, n=8-13 par groupe. Statistique : Two-Way ANOVA et test post-hoc Bonferroni et One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec $*=p<0.05$ pour RCIU-R vs Contrôle.

test post-hoc Newman Keuls. La courbe de croissance a été analysée par une *two-way* ANOVA suivie d'un test post-hoc Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par des astérisques, avec * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Résultats :

Impact de l'alimentation post-natale précoce sur la croissance pondérale des souris RCIU.

Comme présenté dans l'étude précédente, nous avons suivi le développement pondéral des souris RCIU et contrôles durant trois mois et étudié l'effet de différents régimes alimentaire en période de lactation. Je le remets ici car le poids a un rôle important dans la maturation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Les souris nées avec un RCIU et restreintes en période de lactation (RCIU-R) présentent un poids diminué dès le 5^{ème} jour de vie (P5), jour du démarrage des pesées, et ne présentent pas de rattrapage de la croissance par la suite. Les femelles RCIU-N possèdent une courbe de croissance identique à celle des contrôles avec un rattrapage rapide de la croissance dès P5. Les souris RCIU-S tendent à devenir plus lourdes à 3 mois de vie (**Figure 27A**). Nous avons ensuite analysé si le développement de l'axe somatotrope pouvait être impacté par la dénutrition *in utero*, et si les souris nées avec un RCIU pouvaient présenter une taille naso-anale différente des souris contrôles à l'âge adulte. Les souris RCIU présentent globalement une tendance non significative à être plus petites que les contrôles indépendamment de leurs régimes post-natals précoces (**Figure 27B**). Nous avons mesuré l'index de Lee qui correspond à l'indice de masse corporel (IMC) chez la souris et nos résultats montrent une augmentation significative pour les souris sur-nourries suite à un RCIU (RCIU-S) comparativement aux contrôles (**Figure 27C**). A l'inverse, l'IMC n'est pas significativement modifié chez les RCIU-R, bien qu'une tendance à la diminution soit observée.

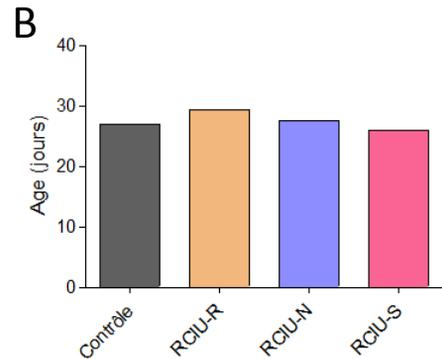
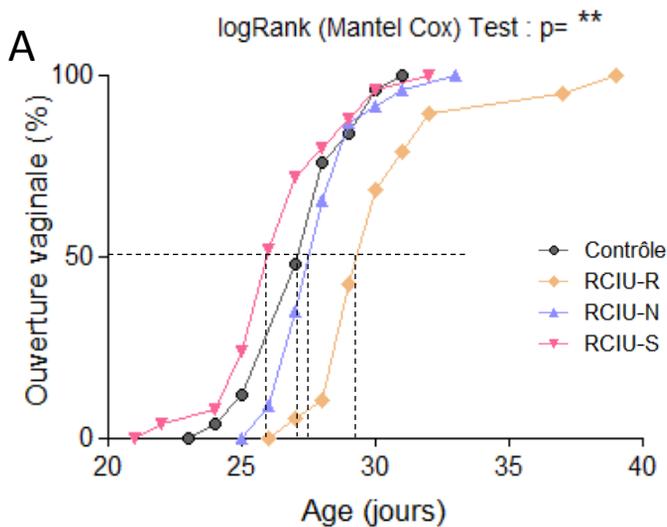


Figure 28: Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur l'âge de l'ouverture vaginale chez la souris RCIU. Courbe de fréquence cumulée croissante de l'âge à l'ouverture vaginale (**A**) et l'âge auquel 50% des souris ont eu leur ouverture vaginale dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, $n=18-25$ par groupe. Statistique : test de Mantel-Cox, avec $**=p<0.01$.

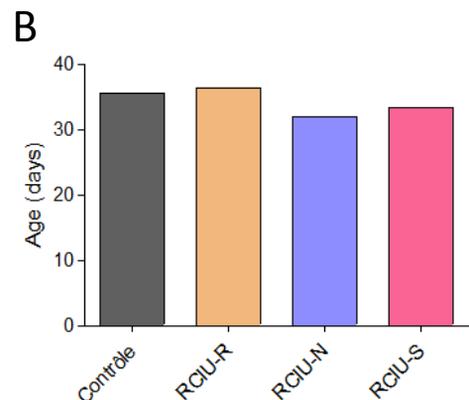
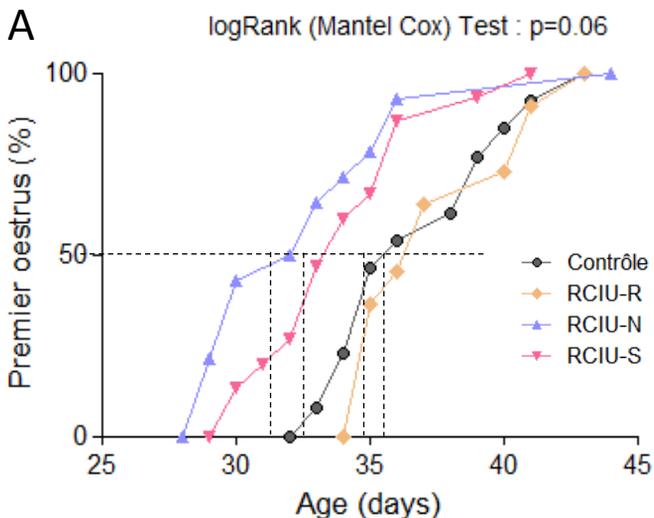


Figure 29: Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur l'âge du premier œstrus chez la souris RCIU. Courbe de fréquence cumulée croissante de l'âge du premier œstrus (**A**) et l'âge auquel 50% des souris ont eu leur premier œstrus dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, $n=11-15$ par groupe. Statistique : test de Mantel-Cox.

Impact de l'alimentation post-natale précoce sur le développement de la maturation de la fonction reproductrice des souris RCIU.

Afin d'étudier la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, nous avons étudié tout d'abord deux signes de puberté chez la souris : l'ouverture vaginale et l'âge d'apparition du premier œstrus. Nous avons pu observer qu'une surnutrition chez les souris RCIU (RCIU-S) entraînait une ouverture vaginale plus précoce que chez les souris Contrôles : en effet, la moitié des souris ont eu une ouverture vaginale à 25,9 jours alors que les souris Contrôles l'atteignent à 27,5 jours (**Figure 28**). A l'inverse, la restriction entraîne un retard du début de la puberté avec un âge auquel 50% des souris ont eu leur ouverture vaginale de 29,2 jours. Les souris RCIU-N ont un âge moyen d'ouverture vaginale similaire aux souris Contrôles.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'âge du premier œstrus chez ces souris. De manière intéressante, nous avons pu observer que les souris RCIU sur-nourries ou nourries normalement en période de lactation ont leur premier œstrus plus tôt que les souris Contrôles : l'âge auquel la moitié des souris ont eu leur premier œstrus est de 32 jours pour les souris RCIU-N, 33,3 pour les souris RCIU-S et 35,5 jours pour les souris Contrôles. Les souris RCIU-R ont un premier œstrus légèrement retardé (âge médian de 36,3 jours) (**Figure 29**).

A l'aide des courbes d'ouverture vaginales qui sont le premier signe d'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, nous avons défini le 28^{ème} jour de vie comme jour optimal pour l'étude des effets au niveau de cet axe. En effet à cet âge, tous les groupes ont commencé leur ouverture vaginale et pour les groupes Contrôles/RCIU-N/RCIU-S, elles ne sont pas toutes ouvertes. A cet âge, nous avons observé une diminution du poids corporel des souris RCIU-R mais pas d'impact des régimes normaux ou de la surnutrition chez les souris RCIU par rapport aux contrôles (**Figure 30A**). De manière intéressante, nous avons observé une diminution significative du poids de l'utérus (qu'il soit ou non rapporté au poids du corps) chez les souris RCIU-R et RCIU-N, et une forte tendance pour les souris RCIU-S (**Figure 30B**).

Nous nous sommes ensuite intéressés à quelques acteurs de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique et notamment à l'expression des ARNm de Kisspeptine (Kiss1), le

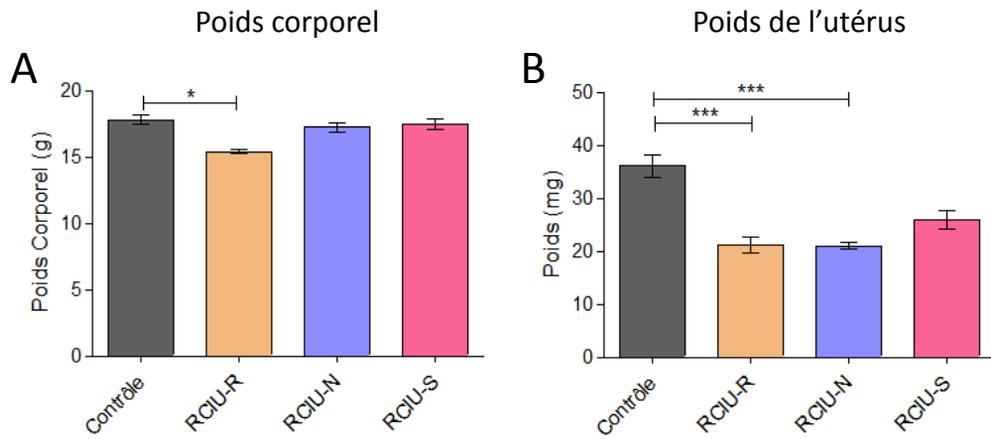


Figure 30 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur le poids corporel et celui de l'utérus chez la souris RCIU à 28 jours. Poids corporel (A) et poids de l'utérus (B) dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, n=8-9 par groupe. Statistique : test de Kruskal-Wallis, avec *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001.

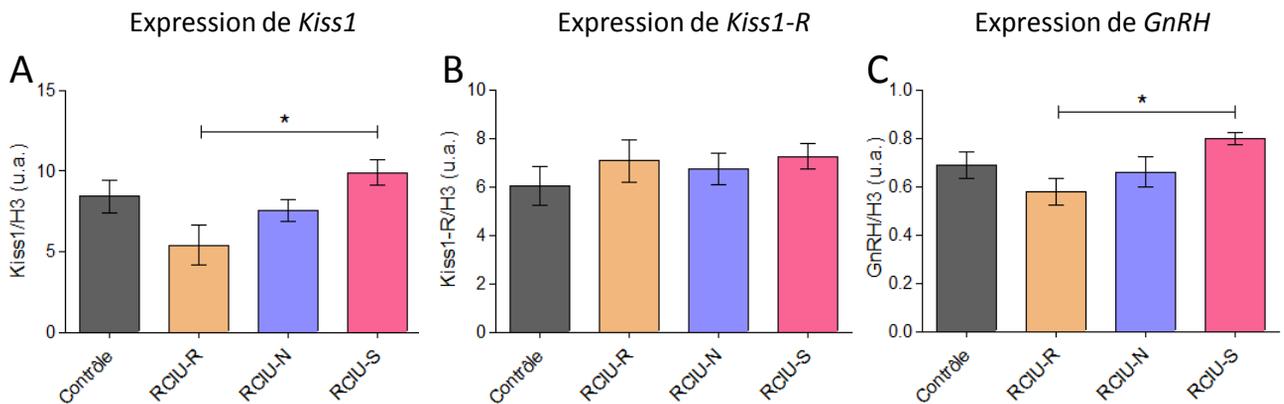


Figure 31 : Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur l'expression de gènes de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique chez la souris RCIU à 28 jours. Niveaux d'expression de *Kiss1* (A), du récepteur de Kiss (Kiss1-R, B) et de *GnRH* (C) dans l'hypothalamus des différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Les expressions relatives par rapport à H3 sont présentées en unités arbitraires (u.a.). Moyenne \pm SEM, n=5-6 par groupe. Statistique : test de Kruskal-Wallis, avec *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.01.

récepteur de Kisspeptine : Kiss-1R et GnRH. Les groupes RCIU-N et Contrôle présentent des niveaux d'expression de *Kiss1*, *Kiss-1R* et *GnRH* similaires. Concernant la surnutrition ou la restriction durant la lactation, il ne semble pas y avoir d'effet sur l'expression de *Kiss-1R*. Nous observons une tendance à une augmentation des ARNm *Kiss1* et *GnRH* suite à une surnutrition en période de lactation mais ceci de manière non significative. A l'inverse, les souris RCIU-R ont tendance à présenter une diminution de l'expression de *Kiss1* et *GnRH* (**Figure 31**) L'effectif de souris étant un peu faible, une analyse sur une cohorte plus conséquente permettrait peut-être d'atteindre les seuils de significativité.

Impact de l'alimentation post-natale précoce sur la reproduction des souris RCIU.

Sur une seconde cohorte de souris, nous avons étudié la fonction de reproduction des souris adultes. Tout d'abord, nous avons mesuré la durée moyenne d'un cycle œstral chez nos différents groupes de souris. Nous avons pu observer que les souris RCIU-N et RCIU-S avaient un cycle œstral bien plus court (RCIU-N : 5,2 jours et RCIU-S : 5,8 jours) que les souris RCIU-R et Contrôles (RCIU-R : 6,9 et Contrôles : 8,1 jours) (**Figure 32**).

Ces souris ont ensuite été euthanasiées entre 3 mois et demi et 4 mois d'âge au moment leur pro-œstrus. A cet âge, les souris RCIU-R ont toujours un poids réduit par rapport aux trois autres groupes, bien que la différence ne soit pas significative (**Figure 33A**). En revanche, les souris ne présentent plus d'altération du poids de leur utérus lorsque celui-ci est pris dans une phase de pro-œstrus (**Figure 33B**). Une mesure en étape de di-estrus serait nécessaire pour voir si les modifications observées à 28 jours sont maintenues à l'âge adulte.

Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés aux capacités reproductrices chez ces différentes souris. Pour cela, nous avons mis les souris en accouplement à l'âge de 3 mois avec des mâles WT du même âge. Nous avons mesuré la latence pour obtenir une première portée, qui semble similaire entre les groupes (**Figure 34A**). Lors de la première portée, il y avait en moyenne le même nombre de petits dans une portée issue d'une mère RCIU-N ou contrôle. Les souris RCIU-R avaient tendance à avoir une portée plus importante et à l'inverse les RCIU-S des portées moins importantes, mais de manière non significative

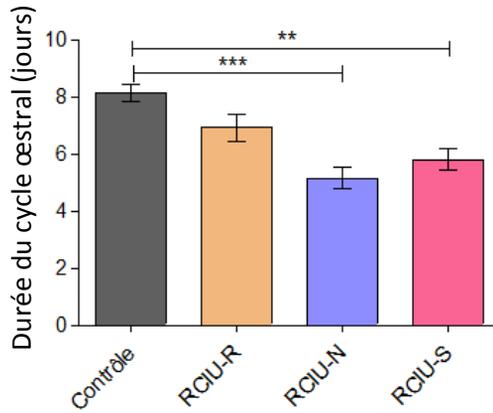


Figure 32 : Effet d’une modification de l’alimentation durant la lactation sur la durée du cycle œstral chez la souris RCIU adulte. La durée du cycle œstral a été estimée entre deux œstrus consécutifs et est représentée par la moyenne de plusieurs cycles durant 1 mois dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, n=9-15 par groupe. Statistique : test de Kruskal-Wallis, avec *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.01.

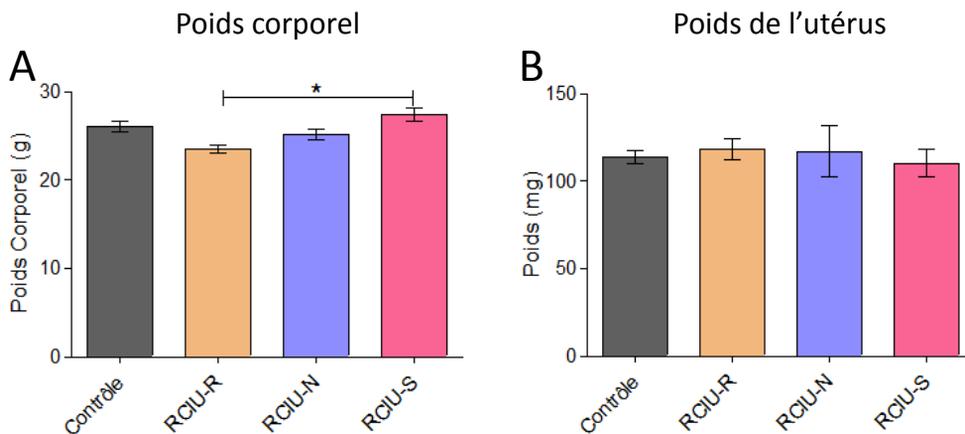


Figure 33 : Effet d’une modification de l’alimentation durant la lactation sur le poids corporel et l’utérus chez la souris RCIU adulte en période de pro-oestrus. Poids corporel (A) et poids de l’utérus (B) dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, n=4-10 par groupe. Statistique : test de Kruskal-Wallis, avec *=p<0.05.

(Figure 34B). Durant les 105 jours d'accouplement continu, tous les groupes de souris ont fait en moyenne 4 à 5 portées et ont donc une productivité similaire **(Figure 34C)**. De même, lorsque l'on fait la moyenne du nombre de petits par femelle sur l'ensemble des portées, seule la tendance des souris RCIU-S à avoir moins de petits a été retrouvée mais toujours de manière non significative **(Figure 34D)**.

Conclusion :

Parmi les mécanismes pouvant être affectés par la nutrition en période périnatale, une altération du développement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et des gonades est suspectée. Au sein du laboratoire, nous avons développé un modèle de RCIU induit par un régime hypo-protéique durant la dernière semaine de gestation et modulé la nutrition en période de lactation afin d'étudier la susceptibilité de développer des pathologies ultérieures et les mécanismes sous-jacents. La taille des portées a été modifiée afin d'induire en période de lactation, une nutrition restreinte (RCIU-R), normale (RCIU-N) ou une surnutrition (RCIU-S). Les résultats indiquent un rattrapage rapide de la croissance chez les souris RCIU sur-nourries ou normalement nourries au cours de la lactation (RCIU-S et RCIU-N) sans altération significative de la taille à trois mois. Cependant, le maintien de la restriction au cours de la lactation (RCIU-R) engendre une diminution staturale et pondérale à trois mois.

La période foetale *per se* ne semble pas impacter la date d'ouverture vaginale car nous n'avons pas observé de différence entre les souris RCIU-N et les souris Contrôles. En revanche, la nutrition durant la période de lactation semble importante puisqu'une restriction induit un retard dans l'âge de l'ouverture vaginale alors qu'une surnutrition entraîne un âge d'ouverture vaginale plus précoce. Ceci est cohérent avec les résultats observés par Castellano *et al* qui avait étudié l'ouverture vaginale chez des rats dont les portées avaient été modulées durant la lactation (Castellano *et al.* 2011). De manière intéressante, l'âge du premier œstrus est avancé chez les souris RCIU-S et RCIU-N alors qu'aucun changement n'est observé chez les souris RCIU-R. Ainsi, une augmentation (même relative) de nutrition entre les périodes foetale et post-natale semblerait induire une entrée dans le cycle œstral plus précoce. Au niveau moléculaire, les résultats préliminaires à 28

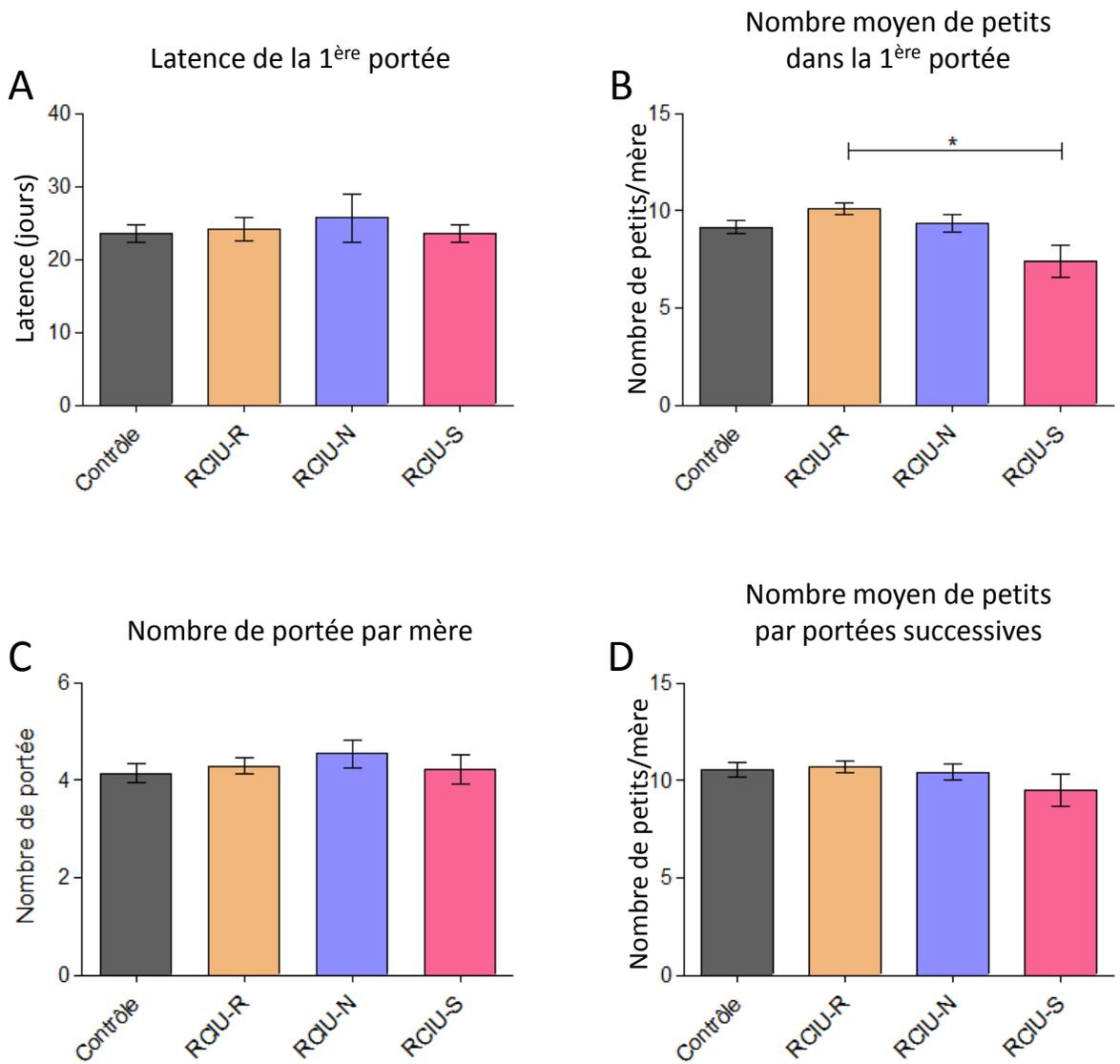


Figure 34: Effet d'une modification de l'alimentation durant la lactation sur les capacités de reproduction chez la souris RCIU adulte. Le délai pour avoir la première portée suite à la mise en accouplement (A), le nombre de petits dans la première portée (B), le nombre de portée en 105 jours (C) et la moyenne du nombre de petits par portée (D) dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) durant la lactation et les souris contrôles. Moyenne \pm SEM, n=11-14 par groupe. Statistique : test de Kruskal-Wallis, avec *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

jours indiquent que le RCIU et un changement de nutrition durant la lactation semblent être associés à une tendance non significative d'altération de l'expression de *Kiss1* et *GnRH* en cas de changement de taille des portées durant la lactation. Ainsi, ces données nous indiquent que la nutrition en période de lactation serait importante pour la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique.

A l'âge adulte, nous avons observé que l'altération de la nutrition en période fœtale induisait un cycle œstral plus court quand il y avait un rattrapage rapide de la croissance en début de période de lactation (groupes RCIU-N et RCIU-S). Une accélération des cycles œstraux pourrait entraîner un épuisement plus rapide des follicules et ainsi altérer les capacités de reproduction à long terme. Néanmoins, les souris adultes euthanasiées lors de la phase de pro-œstrus ne présentent pas d'altération du poids de l'utérus, contrairement à ce qui a été observée à 28 jours. Durant le pro-œstrus, il y a une maturation folliculaire sous le contrôle de la FSH et une synthèse d'œstrogène avec un pic d'œstradiol qui annonce le début de l'œstrus. Ceci pourrait être un marqueur de la fonction de reproduction. En ce sens, nous avons étudié les capacités de reproduction des souris à l'âge adulte. Nous avons pu observer une tendance des souris RCIU-S à avoir des portées de souriceaux moins nombreuses dès la première portée ainsi que sur les suivantes. Lors de la première portée, les souris RCIU-R ont tendance à avoir plus de petits mais cela n'est pas retrouvé par la suite. Nous avons ici étudié les capacités reproductrices adultes des souris RCIU. Nous avons donc arrêté cette expérience après 105 jours d'accouplement. Si nous voulons vérifier les capacités de reproduction à long terme, nous pourrions maintenir ces souris en accouplement jusqu'à l'arrêt total de mises bas. D'autre part, lors du sacrifice de ces souris, nous avons prélevé les ovaires dont l'un a été mis en paraffine pour de futures études histologiques. Nous souhaiterions compter le nombre de follicules en les différenciant selon leur stade de développement et notamment les follicules de Graaf afin de savoir s'il peut y avoir une altération du développement folliculaire (Leonhardt *et al.* 2003). En effet, une diminution du nombre de follicule de Graaf (le follicule mature) pourrait notamment engendrer une diminution des capacités reproductives à long terme.

L'effet le plus important semble impliquer la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique qui dépend lui-même des neurones à kisspeptine. Nous avons mesuré

ici l'expression de Kisspeptine totale. L'activation de cet axe dépendrait notamment du Kisspeptine de l'ARC et ainsi, une étude plus fine pourrait être intéressante.

D'autre part, une analyse plus approfondie des acteurs de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique est nécessaire. En effet, nous avons gardé les plasmas de nos souris à 28 jours et à l'âge adulte afin de mesurer les taux de LH et FSH hypophysaires, ainsi que les concentrations circulantes en stéroïdes sexuels. Parmi les mécanismes sous-jacents, il serait intéressant d'étudier différentes marques épigénétiques qui pourraient être impliquées dans la programmation fœtale suite à une altération de l'environnement maternel. Par exemple, les gamètes femelles pourraient être sensibles aux perturbations épigénétiques pendant la maturation folliculaire qui se déroule dans notre modèle murin durant la lactation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Saad, K. and D. Fraser (2010). "Maternal nutrition and birth outcomes." Epidemiol Rev **32**: 5-25.
- Aiken, C. E. and S. E. Ozanne (2013). "Sex differences in developmental programming models." Reproduction **145**(1): R1-13.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria and S. C. Smith, Jr. (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." Circulation **120**(16): 1640-1645.
- Alisi, A., N. Panera, C. Agostoni and V. Nobili (2011). "Intrauterine growth retardation and nonalcoholic Fatty liver disease in children." Int J Endocrinol **2011**: 269853.
- Allan, G. J., D. J. Flint and K. Patel (2001). "Insulin-like growth factor axis during embryonic development." Reproduction **122**(1): 31-39.
- Arantes, V. C., V. P. Teixeira, M. A. Reis, M. Q. Latorraca, A. R. Leite, E. M. Carneiro, A. T. Yamada and A. C. Boschero (2002). "Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation." J Nutr **132**(10): 3030-3035.
- Atkins, A. F., J. M. Watt, P. Milan, P. Davies and J. S. Crawford (1981). "A longitudinal study of cardiovascular dynamic changes throughout pregnancy." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **12**(4): 215-224.
- Bai, J., F. W. Wong, A. Bauman and M. Mohsin (2002). "Parity and pregnancy outcomes." Am J Obstet Gynecol **186**(2): 274-278.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." Cell Res **21**(3): 381-395.
- Barker, D. J., A. R. Bull, C. Osmond and S. J. Simmonds (1990). "Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life." BMJ **301**(6746): 259-262.
- Barker, D. J., C. N. Hales, C. H. Fall, C. Osmond, K. Phipps and P. M. Clark (1993). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth." Diabetologia **36**(1): 62-67.
- Barker, D. J., C. Osmond, J. Golding, D. Kuh and M. E. Wadsworth (1989). "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease." BMJ **298**(6673): 564-567.
- Barker, D. J., P. D. Winter, C. Osmond, B. Margetts and S. J. Simmonds (1989). "Weight in infancy and death from ischaemic heart disease." Lancet **2**(8663): 577-580.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev and K. Zhao (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." Cell **129**(4): 823-837.
- Bateson, P., D. Barker, T. Clutton-Brock, D. Deb, B. D'Udine, R. A. Foley, P. Gluckman, K. Godfrey, T. Kirkwood, M. M. Lahr, J. McNamara, N. B. Metcalfe, P. Monaghan, H. G. Spencer and S. E. Sultan (2004). "Developmental plasticity and human health." Nature **430**(6998): 419-421.

- Battaglia, F. C. and L. O. Lubchenco (1967). "A practical classification of newborn infants by weight and gestational age." J Pediatr **71**(2): 159-163.
- Baulande, S., A. Criqui and M. Duthieuw (2014). "[Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers]." Med Sci (Paris) **30**(3): 289-296.
- Begum, G., A. Davies, A. Stevens, M. Oliver, A. Jaquier, J. Challis, J. Harding, F. Bloomfield and A. White (2013). "Maternal undernutrition programs tissue-specific epigenetic changes in the glucocorticoid receptor in adult offspring." Endocrinology **154**(12): 4560-4569.
- Benhamou, D., V. Labi, R. Novak, I. Dai, S. Shafir-Alon, A. Weiss, R. Gaujoux, R. Arnold, S. S. Shen-Orr, K. Rajewsky and D. Melamed (2016). "A c-Myc/miR17-92/Pten Axis Controls PI3K-Mediated Positive and Negative Selection in B Cell Development and Reconstitutes CD19 Deficiency." Cell Rep **16**(2): 419-431.
- Berney, D. M., M. Desai, D. J. Palmer, S. Greenwald, A. Brown, C. N. Hales and C. L. Berry (1997). "The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation." J Pathol **183**(1): 109-115.
- Bernstein, B. E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D. K. Bailey, D. J. Huebert, S. McMahon, E. K. Karlsson, E. J. Kulbokas, 3rd, T. R. Gingeras, S. L. Schreiber and E. S. Lander (2005). "Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse." Cell **120**(2): 169-181.
- Bertin, E., M. N. Gangnerau, D. Bailbe and B. Portha (1999). "Glucose metabolism and beta-cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): E11-17.
- Bertin, E., M. N. Gangnerau, G. Bellon, D. Bailbe, A. Arbelot De Vacqueur and B. Portha (2002). "Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(3): R623-630.
- Blondeau, B., I. Avril, B. Duchene and B. Breant (2002). "Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition." Diabetologia **45**(3): 394-401.
- Blondeau, B., A. Garofano, P. Czernichow and B. Breant (1999). "Age-dependent inability of the endocrine pancreas to adapt to pregnancy: a long-term consequence of perinatal malnutrition in the rat." Endocrinology **140**(9): 4208-4213.
- Bluet-Pajot, M. T., J. Epelbaum, D. Gourdj, C. Hammond and C. Kordon (1998). "Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion." Cell Mol Neurobiol **18**(1): 101-123.
- Bouret, S. G., S. J. Draper and R. B. Simerly (2004). "Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding." Science **304**(5667): 108-110.
- Brenner, B. M., D. L. Garcia and S. Anderson (1988). "Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other?" Am J Hypertens **1**(4 Pt 1): 335-347.
- Breton, C. (2013). "The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation." J Endocrinol **216**(2): R19-31.

- Breton, C., M. A. Lukaszewski, P. Y. Risold, M. Enache, J. Guillemot, G. Riviere, F. Delahaye, J. Lesage, I. Dutriez-Casteloot, C. Laborie and D. Vieau (2009). "Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(3): E462-472.
- Buchanan, T. A. and A. H. Xiang (2005). "Gestational diabetes mellitus." J Clin Invest **115**(3): 485-491.
- Buchanan, T. A., A. H. Xiang and K. A. Page (2012). "Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy." Nat Rev Endocrinol **8**(11): 639-649.
- Calkins, K. and S. U. Devaskar (2011). "Fetal origins of adult disease." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **41**(6): 158-176.
- Caron, E., P. Ciofi, V. Prevot and S. G. Bouret (2012). "Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function." J Neurosci **32**(33): 11486-11494.
- Castellano, J. M., A. H. Bentsen, M. A. Sanchez-Garrido, F. Ruiz-Pino, M. Romero, D. Garcia-Galiano, E. Aguilar, L. Pinilla, C. Dieguez, J. D. Mikkelsen and M. Tena-Sempere (2011). "Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system." Endocrinology **152**(9): 3396-3408.
- Challen, G. A., D. Sun, M. Jeong, M. Luo, J. Jelinek, J. S. Berg, C. Bock, A. Vasanthakumar, H. Gu, Y. Xi, S. Liang, Y. Lu, G. J. Darlington, A. Meissner, J. P. Issa, L. A. Godley, W. Li and M. A. Goodell (2011). "Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation." Nat Genet **44**(1): 23-31.
- Challen, G. A., D. Sun, A. Mayle, M. Jeong, M. Luo, B. Rodriguez, C. Mallaney, H. Celik, L. Yang, Z. Xia, S. Cullen, J. Berg, Y. Zheng, G. J. Darlington, W. Li and M. A. Goodell (2014). "Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **15**(3): 350-364.
- Chapman, A. B., W. T. Abraham, S. Zamudio, C. Coffin, A. Merouani, D. Young, A. Johnson, F. Osorio, C. Goldberg, L. G. Moore, T. Dahms and R. W. Schrier (1998). "Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy." Kidney Int **54**(6): 2056-2063.
- Charles, M. A., C. Delpierre and B. Breant (2016). "[Developmental origin of health and adult diseases (DOHaD): evolution of a concept over three decades]." Med Sci (Paris) **32**(1): 15-20.
- Chen, P. Y., A. Ganguly, L. Rubbi, L. D. Orozco, M. Morselli, D. Ashraf, A. Jaroszewicz, S. Feng, S. E. Jacobsen, A. Nakano, S. U. Devaskar and M. Pellegrini (2013). "Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression." Physiol Genomics **45**(14): 565-576.
- Chen, Q., M. Yan, Z. Cao, X. Li, Y. Zhang, J. Shi, G. H. Feng, H. Peng, X. Zhang, J. Qian, E. Duan, Q. Zhai and Q. Zhou (2016). "Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder." Science **351**(6271): 397-400.
- Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, K. Zen and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." Cell Res **18**(10): 997-1006.

- Cheng, X. and R. M. Blumenthal (2008). "Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective." Structure **16**(3): 341-350.
- Chowen, J. A., L. M. Frago and J. Argente (2004). "The regulation of GH secretion by sex steroids." Eur J Endocrinol **151 Suppl 3**: U95-100.
- Cianfarani, S., C. Martinez, A. Maiorana, G. Scire, G. L. Spadoni and S. Boemi (2004). "Adiponectin levels are reduced in children born small for gestational age and are inversely related to postnatal catch-up growth." J Clin Endocrinol Metab **89**(3): 1346-1351.
- Clayton, P. E., S. Cianfarani, P. Czernichow, G. Johannsson, R. Rapaport and A. Rogol (2007). "Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 804-810.
- Cogswell, M. E. and R. Yip (1995). "The influence of fetal and maternal factors on the distribution of birthweight." Semin Perinatol **19**(3): 222-240.
- Coupe, B., V. Amarger, I. Grit, A. Benani and P. Parnet (2010). "Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin." Endocrinology **151**(2): 702-713.
- Coupe, B., E. Delamaire, C. Hoebler, I. Grit, P. Even, G. Fromentin, D. Darmaun and P. Parnet (2011). "Hypothalamus integrity and appetite regulation in low birth weight rats reared artificially on a high-protein milk formula." J Nutr Biochem **22**(10): 956-963.
- Coupe, B., I. Grit, D. Darmaun and P. Parnet (2009). "The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **297**(3): R813-824.
- Coupe, B., I. Grit, P. Hulin, G. Randuineau and P. Parnet (2012). "Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis." PLoS One **7**(1): e30616.
- d'Anglemont de Tassigny, X. and W. H. Colledge (2010). "The role of kisspeptin signaling in reproduction." Physiology (Bethesda) **25**(4): 207-217.
- de Bruin, J. P., M. Dorland, H. W. Bruinse, W. Spliet, P. G. Nikkels and E. R. Te Velde (1998). "Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development." Early Hum Dev **51**(1): 39-46.
- DeChiara, T. M., A. Efstratiadis and E. J. Robertson (1990). "A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting." Nature **345**(6270): 78-80.
- Decourtye, L., E. Mire, M. Clemessy, V. Heurtier, T. Ledent, I. C. Robinson, P. Mollard, J. Epelbaum, M. J. Meaney, S. Garel, Y. Le Bouc and L. Kappeler (2017). "IGF-1 Induces GHRH Neuronal Axon Elongation during Early Postnatal Life in Mice." PLoS One **12**(1): e0170083.
- Delahaye, F., C. Breton, P. Y. Risold, M. Enache, I. Dutriez-Casteloot, C. Laborie, J. Lesage and D. Vieau (2008). "Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups." Endocrinology **149**(2): 470-475.

- Delahaye, F., M. A. Lukaszewski, J. S. Watzet, O. Cisse, I. Dutriez-Casteloot, I. Fajardy, V. Montel, A. Dickes-Coopman, C. Laborie, J. Lesage, C. Breton and D. Vieau (2010). "Maternal perinatal undernutrition programs a "brown-like" phenotype of gonadal white fat in male rat at weaning." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **299**(1): R101-110.
- Desai, M., C. D. Byrne, J. Zhang, C. J. Petry, A. Lucas and C. N. Hales (1997). "Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet." Am J Physiol **272**(5 Pt 1): G1083-1090.
- Desai, M., N. J. Crowther, A. Lucas and C. N. Hales (1996). "Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers." Br J Nutr **76**(4): 591-603.
- Desai, M., N. J. Crowther, S. E. Ozanne, A. Lucas and C. N. Hales (1995). "Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life." Biochem Soc Trans **23**(2): 331-335.
- Desforges, M. and C. P. Sibley (2010). "Placental nutrient supply and fetal growth." Int J Dev Biol **54**(2-3): 377-390.
- Dobbing, J. and J. Sands (1979). "Comparative aspects of the brain growth spurt." Early Hum Dev **3**(1): 79-83.
- Dodge, J. E., M. Okano, F. Dick, N. Tsujimoto, T. Chen, S. Wang, Y. Ueda, N. Dyson and E. Li (2005). "Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization." J Biol Chem **280**(18): 17986-17991.
- Donahue, L. R. and W. G. Beamer (1993). "Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4." J Endocrinol **136**(1): 91-104.
- Dupont, C., A. G. Cordier, C. Junien, B. Mandon-Pepin, R. Levy and P. Chavatte-Palmer (2012). "Maternal environment and the reproductive function of the offspring." Theriogenology **78**(7): 1405-1414.
- Dwyer, C. M. and N. C. Stickland (1992). "Does the anatomical location of a muscle affect the influence of undernutrition on muscle fibre number?" J Anat **181** (Pt 2): 373-376.
- Eddy, S. R. (2001). "Non-coding RNA genes and the modern RNA world." Nat Rev Genet **2**(12): 919-929.
- Eicher, E. M. and W. G. Beamer (1976). "Inherited ateliotic dwarfism in mice. Characteristics of the mutation, little, on chromosome 6." J Hered **67**(2): 87-91.
- Englund, J., W. P. Glezen and P. A. Piedra (1998). "Maternal immunization against viral disease." Vaccine **16**(14-15): 1456-1463.
- Erhuma, A., A. M. Salter, D. V. Sculley, S. C. Langley-Evans and A. J. Bennett (2007). "Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(6): E1702-1714.

- Eriksson, J. G., T. Forsen, J. Tuomilehto, P. D. Winter, C. Osmond and D. J. Barker (1999). "Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study." BMJ **318**(7181): 427-431.
- Farhy, L. S., M. Straume, M. L. Johnson, B. Kovatchev and J. D. Veldhuis (2002). "Unequal autonegative feedback by GH models the sexual dimorphism in GH secretory dynamics." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **282**(3): R753-764.
- Feng, Y., J. Liu, Y. Kang, Y. He, B. Liang, P. Yang and Z. Yu (2014). "miR-19a acts as an oncogenic microRNA and is up-regulated in bladder cancer." J Exp Clin Cancer Res **33**: 67.
- Fenton, T. R. and J. H. Kim (2013). "A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants." BMC Pediatr **13**: 59.
- Ferguson, A. C. (1978). "Prolonged impairment of cellular immunity in children with intrauterine growth retardation." J Pediatr **93**(1): 52-56.
- Ferland-McCollough, D., D. S. Fernandez-Twinn, I. G. Cannell, H. David, M. Warner, A. A. Vaag, J. Bork-Jensen, C. Brons, T. W. Gant, A. E. Willis, K. Siddle, M. Bushell and S. E. Ozanne (2012). "Programming of adipose tissue miR-483-3p and GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes." Cell Death Differ **19**(6): 1003-1012.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya and N. Sonenberg (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-114.
- Fowden, A. L. (2003). "The insulin-like growth factors and feto-placental growth." Placenta **24**(8-9): 803-812.
- Fowden, A. L., D. A. Giussani and A. J. Forhead (2006). "Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences." Physiology (Bethesda) **21**: 29-37.
- Fowden, A. L. and D. J. Hill (2001). "Intra-uterine programming of the endocrine pancreas." Br Med Bull **60**: 123-142.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res **19**(1): 92-105.
- Fuks, F. (2005). "DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 490-495.
- Fullston, T., E. M. Ohlsson Teague, N. O. Palmer, M. J. DeBlasio, M. Mitchell, M. Corbett, C. G. Print, J. A. Owens and M. Lane (2013). "Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content." FASEB J **27**(10): 4226-4243.
- Gabory, A., L. Attig and C. Junien (2011). "Developmental programming and epigenetics." Am J Clin Nutr **94**(6 Suppl): 1943S-1952S.
- Gabory, A., P. Chavatte-Palmer, A. Vambergue and A. Tarrade (2016). "[Impact of maternal obesity and diabetes on placental function]." Med Sci (Paris) **32**(1): 66-73.
- Gabory, A., L. Ferry, I. Fajardy, L. Jouneau, J. D. Gothie, A. Vige, C. Fleur, S. Mayeur, C. Gallou-Kabani, M. S. Gross, L. Attig, A. Vambergue, J. Lesage, B. Reusens, D. Vieau, C. Remacle, J. P. Jais and

- C. Junien (2012). "Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta." *PLoS One* **7**(11): e47986.
- Gallou-Kabani, C., A. Gabory, J. Tost, M. Karimi, S. Mayeur, J. Lesage, E. Boudadi, M. S. Gross, J. Taurelle, A. Vige, C. Breton, B. Reusens, C. Remacle, D. Vieau, T. J. Ekstrom, J. P. Jais and C. Junien (2010). "Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet." *PLoS One* **5**(12): e14398.
- Garofano, A., P. Czernichow and B. Breant (1997). "In utero undernutrition impairs rat beta-cell development." *Diabetologia* **40**(10): 1231-1234.
- Gicquel, C. and Y. Le Bouc (2006). "Hormonal regulation of fetal growth." *Horm Res* **65** Suppl 3: 28-33.
- Gilbert, W. M., T. S. Nesbitt and B. Danielsen (1999). "Childbearing beyond age 40: pregnancy outcome in 24,032 cases." *Obstet Gynecol* **93**(1): 9-14.
- Giudice, L. C., F. de Zegher, S. E. Gargosky, B. A. Dsupin, L. de las Fuentes, R. A. Crystal, R. L. Hintz and R. G. Rosenfeld (1995). "Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth." *J Clin Endocrinol Metab* **80**(5): 1548-1555.
- Gluckman, P. D. (1995). "Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors." *J Clin Endocrinol Metab* **80**(4): 1047-1050.
- Gluckman, P. D., A. J. Gunn, A. Wray, W. S. Cutfield, P. G. Chatelain, O. Guilbaud, G. R. Ambler, P. Wilton and K. Albertsson-Wikland (1992). "Congenital idiopathic growth hormone deficiency associated with prenatal and early postnatal growth failure. The International Board of the Kabi Pharmacia International Growth Study." *J Pediatr* **121**(6): 920-923.
- Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004). "The developmental origins of the metabolic syndrome." *Trends Endocrinol Metab* **15**(4): 183-187.
- Gluckman, P. D., M. A. Hanson and H. G. Spencer (2005). "Predictive adaptive responses and human evolution." *Trends Ecol Evol* **20**(10): 527-533.
- Godfrey, K., S. Robinson, D. J. Barker, C. Osmond and V. Cox (1996). "Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth." *BMJ* **312**(7028): 410-414.
- Grandjean, V., S. Fourre, D. A. De Abreu, M. A. Derieppe, J. J. Remy and M. Rassoulzadegan (2015). "RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders." *Sci Rep* **5**: 18193.
- Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman and A. J. Enright (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D140-144.
- Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., J. I. Cleeman, S. C. Smith, Jr. and C. Lenfant (2004). "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." *Circulation* **109**(3): 433-438.

- Guler, H. P., J. Zapf, E. Scheiwiller and E. R. Froesch (1988). "Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4889-4893.
- Ha, M. and V. N. Kim (2014). "Regulation of microRNA biogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(8): 509-524.
- Hack, M., N. Breslau, B. Weissman, D. Aram, N. Klein and E. Borawski (1991). "Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age." N Engl J Med **325**(4): 231-237.
- Hadden, D. R. and C. McLaughlin (2009). "Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy." Semin Fetal Neonatal Med **14**(2): 66-71.
- Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." Diabetologia **35**(7): 595-601.
- Hales, C. N., D. J. Barker, P. M. Clark, L. J. Cox, C. Fall, C. Osmond and P. D. Winter (1991). "Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64." BMJ **303**(6809): 1019-1022.
- Handwerger, S. and M. Freemark (2000). "The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development." J Pediatr Endocrinol Metab **13**(4): 343-356.
- Haumaitre, C. (2013). "Epigenetic regulation of pancreatic islets." Curr Diab Rep **13**(5): 624-632.
- Hayashi, K., S. M. Chuva de Sousa Lopes, M. Kaneda, F. Tang, P. Hajkova, K. Lao, D. O'Carroll, P. P. Das, A. Tarakhovsky, E. A. Miska and M. A. Surani (2008). "MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis." PLoS One **3**(3): e1738.
- Hendrix, N. and V. Berghella (2008). "Non-placental causes of intrauterine growth restriction." Semin Perinatol **32**(3): 161-165.
- Henke, J. I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann and M. Niepmann (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." EMBO J **27**(24): 3300-3310.
- Herrera, E. and H. Ortega-Senovilla (2010). "Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development." Clinical Lipidology (5:6): 899-911.
- Hinchliffe, S. A., M. R. Lynch, P. H. Sargent, C. V. Howard and D. Van Velzen (1992). "The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons." Br J Obstet Gynaecol **99**(4): 296-301.
- Hofman, P. L., W. S. Cutfield, E. M. Robinson, R. N. Bergman, R. K. Menon, M. A. Sperling and P. D. Gluckman (1997). "Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation." J Clin Endocrinol Metab **82**(2): 402-406.
- Holzenberger, M., P. Leneuve, G. Hamard, B. Ducos, L. Perin, M. Binoux and Y. Le Bouc (2000). "A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit." Endocrinology **141**(7): 2557-2566.

- Homko, C. J., E. Sivan, E. A. Reece and G. Boden (1999). "Fuel metabolism during pregnancy." Semin Reprod Endocrinol **17**(2): 119-125.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.
- Ibanez, L., N. Potau, G. Enriquez and F. de Zegher (2000). "Reduced uterine and ovarian size in adolescent girls born small for gestational age." Pediatr Res **47**(5): 575-577.
- Ibanez, L., N. Potau, A. Ferrer, F. Rodriguez-Hierro, M. V. Marcos and F. de Zegher (2002). "Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age." J Clin Endocrinol Metab **87**(7): 3391-3393.
- Itoh, H. and N. Kanayama (2018). "Developmental Origins of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)." Adv Exp Med Biol **1012**: 29-39.
- Janssen, H. L., H. W. Reesink, E. J. Lawitz, S. Zeuzem, M. Rodriguez-Torres, K. Patel, A. J. van der Meer, A. K. Patick, A. Chen, Y. Zhou, R. Persson, B. D. King, S. Kauppinen, A. A. Levin and M. R. Hodges (2013). "Treatment of HCV infection by targeting microRNA." N Engl J Med **368**(18): 1685-1694.
- Jaquet, D., J. Leger, P. Czernichow and C. Levy-Marchal (2002). "The effect of in-utero undernutrition on the insulin resistance syndrome." Curr Diab Rep **2**(1): 77-82.
- Jia, Y., R. Cong, R. Li, X. Yang, Q. Sun, N. Parvizi and R. Zhao (2012). "Maternal low-protein diet induces gender-dependent changes in epigenetic regulation of the glucose-6-phosphatase gene in newborn piglet liver." J Nutr **142**(9): 1659-1665.
- Jiang, B., K. M. Godfrey, C. N. Martyn and C. R. Gale (2006). "Birth weight and cardiac structure in children." Pediatrics **117**(2): e257-261.
- Jimenez-Chillaron, J. C., E. Isganaitis, M. Charalambous, S. Gesta, T. Pentinat-Pelegrin, R. R. Faucette, J. P. Otis, A. Chow, R. Diaz, A. Ferguson-Smith and M. E. Patti (2009). "Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice." Diabetes **58**(2): 460-468.
- Jirtle, R. L. and M. K. Skinner (2007). "Environmental epigenomics and disease susceptibility." Nat Rev Genet **8**(4): 253-262.
- Jones, H. N., T. L. Powell and T. Jansson (2007). "Regulation of placental nutrient transport--a review." Placenta **28**(8-9): 763-774.
- Jones, J. I. and D. R. Clemmons (1995). "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions." Endocr Rev **16**(1): 3-34.
- Jousse, C., L. Parry, S. Lambert-Langlais, A. C. Maurin, J. Averous, A. Bruhat, V. Carraro, J. Tost, P. Letteron, P. Chen, R. Jockers, J. M. Launay, J. Mallet and P. Fafournoux (2011). "Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome." FASEB J **25**(9): 3271-3278.
- Kapinas, K. and A. M. Delany (2011). "MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling." Arthritis Res Ther **13**(3): 220.

- Kappeler, L., C. De Magalhaes Filho, P. Leneuve, J. Xu, N. Brunel, C. Chatziantoniou, Y. Le Bouc and M. Holzner (2009). "Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice." Endocrinology **150**(1): 314-323.
- Kappeler, L. and M. J. Meaney (2010). "Epigenetics and parental effects." Bioessays **32**(9): 818-827.
- Kasinski, A. L., K. Kelnar, C. Stahlhut, E. Orellana, J. Zhao, E. Shimer, S. Dysart, X. Chen, A. G. Bader and F. J. Slack (2015). "A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer." Oncogene **34**(27): 3547-3555.
- Kassi, E., P. Pervanidou, G. Kaltsas and G. Chrousos (2011). "Metabolic syndrome: definitions and controversies." BMC Med **9**: 48.
- Keller, A., P. Leidinger, A. Bauer, A. Elsharawy, J. Haas, C. Backes, A. Wendschlag, N. Giese, C. Tjaden, K. Ott, J. Werner, T. Hackert, K. Ruprecht, H. Huwer, J. Huebers, G. Jacobs, P. Rosenstiel, H. Dommisch, A. Schaefer, J. Muller-Quernheim, B. Wullich, B. Keck, N. Graf, J. Reichrath, B. Vogel, A. Nebel, S. U. Jager, P. Staehler, I. Amarantos, V. Boisguerin, C. Staehler, M. Beier, M. Scheffler, M. W. Buchler, J. Wischhusen, S. F. Haeusler, J. Dietl, S. Hofmann, H. P. Lenhof, S. Schreiber, H. A. Katus, W. Rottbauer, B. Meder, J. D. Hoheisel, A. Franke and E. Meese (2011). "Toward the blood-borne miRNome of human diseases." Nat Methods **8**(10): 841-843.
- Keller, G., G. Zimmer, G. Mall, E. Ritz and K. Amann (2003). "Nephron number in patients with primary hypertension." N Engl J Med **348**(2): 101-108.
- Kominiarek, M. A. and A. M. Peaceman (2017). "Gestational weight gain." Am J Obstet Gynecol **217**(6): 642-651.
- Kosaka, N., H. Izumi, K. Sekine and T. Ochiya (2010). "microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk." Silence **1**(1): 7.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kwong, W. Y., A. E. Wild, P. Roberts, A. C. Willis and T. P. Fleming (2000). "Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension." Development **127**(19): 4195-4202.
- Lager, S. and T. L. Powell (2012). "Regulation of nutrient transport across the placenta." J Pregnancy **2012**: 179827.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-858.
- Lain, K. Y. and P. M. Catalano (2007). "Metabolic changes in pregnancy." Clin Obstet Gynecol **50**(4): 938-948.
- Langley-Evans, S. C. (2000). "Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat." Int J Food Sci Nutr **51**(1): 11-17.
- Langley-Evans, S. C., S. J. Welham, R. C. Sherman and A. A. Jackson (1996). "Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension." Clin Sci (Lond) **91**(5): 607-615.

- Lapillonne, A., H. Razafimahefa, V. Rigourd and M. Granier (2011). "[Nutrition of the preterm infant]." Arch Pediatr **18**(3): 313-323.
- Lecoutre, S., F. Oger, C. Pourpe, L. Butruille, L. Marousez, A. Dickes-Coopman, C. Laborie, C. Guinez, J. Lesage, D. Vieau, C. Junien, D. Eberle, A. Gabory, J. Eeckhoutte and C. Breton (2017). "Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner." Mol Metab **6**(8): 922-930.
- Lecoutre, S., C. Pourpe, L. Butruille, L. Marousez, C. Laborie, C. Guinez, J. Lesage, D. Vieau, J. Eeckhoutte, A. Gabory, F. Oger, D. Eberle and C. Breton (2018). "Reduced PPARgamma2 expression in adipose tissue of male rat offspring from obese dams is associated with epigenetic modifications." FASEB J **32**(5): 2768-2778.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Leger, J., C. Levy-Marchal, J. Bloch, A. Pinet, D. Chevenne, D. Porquet, D. Collin and P. Czernichow (1997). "Reduced final height and indications for insulin resistance in 20 year olds born small for gestational age: regional cohort study." BMJ **315**(7104): 341-347.
- Leonard, H., N. Nassar, J. Bourke, E. Blair, S. Mulroy, N. de Klerk and C. Bower (2008). "Relation between intrauterine growth and subsequent intellectual disability in a ten-year population cohort of children in Western Australia." Am J Epidemiol **167**(1): 103-111.
- Leonhardt, M., J. Lesage, D. Croix, I. Dutriez-Casteloot, J. C. Beauvillain and J. P. Dupouy (2003). "Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty." Biol Reprod **68**(2): 390-400.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-798.
- Lien, Y. C., P. Wang and R. A. Simmons (2018). "Intrauterine Growth Retardation Induced Long-Term Gene Dysregulation Is Associated with Altered Histone Modifications in Rat Islets." Diabetes **67**(Suppl1).
- Lillicrop, K. A., E. S. Phillips, A. A. Jackson, M. A. Hanson and G. C. Burdge (2005). "Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring." J Nutr **135**(6): 1382-1386.
- Liu, D. T., H. R. Yao, Y. Y. Li, Y. Y. Song and M. Y. Su (2018). "MicroRNA-19b promotes the migration and invasion of ovarian cancer cells by inhibiting the PTEN/AKT signaling pathway." Oncol Lett **16**(1): 559-565.
- Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson and A. Efstratiadis (1993). "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (*Igf-1*) and type 1 IGF receptor (*Igf1r*)." Cell **75**(1): 59-72.
- Longo, S., L. Bollani, L. Decembrino, A. Di Comite, M. Angelini and M. Stronati (2013). "Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR)." J Matern Fetal Neonatal Med **26**(3): 222-225.
- Longo, S., A. Borghesi, C. Tzialla and M. Stronati (2014). "IUGR and infections." Early Hum Dev **90** **Suppl 1**: S42-44.

- Lopes de Souza, S., R. Orozco-Solis, I. Grit, R. Manhaes de Castro and F. Bolanos-Jimenez (2008). "Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake." Eur J Neurosci **27**(6): 1400-1408.
- Lucas, A., B. A. Baker, M. Desai and C. N. Hales (1996). "Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring." Br J Nutr **76**(4): 605-612.
- Luger, K. and J. C. Hansen (2005). "Nucleosome and chromatin fiber dynamics." Curr Opin Struct Biol **15**(2): 188-196.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature **389**(6648): 251-260.
- Lukaszewski, M. A., S. Mayeur, I. Fajardy, F. Delahaye, I. Dutriez-Casteloot, V. Montel, A. Dickes-Coopman, C. Laborie, J. Lesage, D. Vieau and C. Breton (2011). "Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet." Am J Physiol Endocrinol Metab **301**(3): E548-559.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.
- Magee, T. R., G. Han, B. Cherian, O. Khorram, M. G. Ross and M. Desai (2008). "Down-regulation of transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor in programmed hepatic lipid dysregulation and inflammation in intrauterine growth-restricted offspring." Am J Obstet Gynecol **199**(3): 271 e271-275.
- Makrigiannakis, A., T. Vrekoussis, E. Zoumakis, S. N. Kalantaridou and U. Jeschke (2017). "The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence." Int J Mol Sci **18**(6).
- Malassine, A., J. L. Frendo and D. Evain-Brion (2003). "A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model." Hum Reprod Update **9**(6): 531-539.
- Mandruzzato, G., A. Antsaklis, F. Botet, F. A. Chervenak, F. Figueras, A. Grunebaum, B. Puerto, D. Skupski and M. Stanojevic (2008). "Intrauterine restriction (IUGR)." J Perinat Med **36**(4): 277-281.
- Manning, J. and V. M. Vehaskari (2001). "Low birth weight-associated adult hypertension in the rat." Pediatr Nephrol **16**(5): 417-422.
- Mao, J., X. Zhang, P. T. Sieli, M. T. Falduto, K. E. Torres and C. S. Rosenfeld (2010). "Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5557-5562.
- Martin Agnoux, A., J. P. Antignac, C. Y. Boquien, A. David, E. Desnots, V. Ferchaud-Roucher, D. Darmaun, P. Parnet and M. C. Alexandre-Gouabau (2015). "Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status." J Nutr Biochem **26**(7): 784-795.
- Martin Agnoux, A., A. El Ghaziri, T. Moyon, A. Pagniez, A. David, G. Simard, P. Parnet, E. M. Qannari, D. Darmaun, J. P. Antignac and M. C. Alexandre-Gouabau (2018). "Maternal protein restriction during lactation induces early and lasting plasma metabolomic and hepatic

- lipidomic signatures of the offspring in a rodent programming model." J Nutr Biochem **55**: 124-141.
- Martinez, D., T. Pentinat, S. Ribo, C. Daviaud, V. W. Bloks, J. Cebria, N. Villalmanzo, S. G. Kalko, M. Ramon-Krauel, R. Diaz, T. Plosch, J. Tost and J. C. Jimenez-Chillaron (2014). "In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation." Cell Metab **19**(6): 941-951.
- Mathews, L. S., R. E. Hammer, R. R. Behringer, A. J. D'Ercole, G. I. Bell, R. L. Brinster and R. D. Palmiter (1988). "Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I." Endocrinology **123**(6): 2827-2833.
- Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2006). "Non-coding RNA." Hum Mol Genet **15 Spec No 1**: R17-29.
- McCraib, G. J., A. R. Egan and B. J. Hosking (1991). "Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep. Placental size and its relationship to calcium transfer during late pregnancy." Br J Nutr **65**(2): 157-168.
- McIntire, D. D., S. L. Bloom, B. M. Casey and K. J. Leveno (1999). "Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants." N Engl J Med **340**(16): 1234-1238.
- McKnight, R. A., C. C. Yost, E. K. Zinkhan, Q. Fu, C. W. Callaway and C. M. Fung (2016). "Intrauterine growth restriction inhibits expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase, a regulator of protein translation." Physiol Genomics **48**(8): 616-625.
- McMillen, I. C. and J. S. Robinson (2005). "Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming." Physiol Rev **85**(2): 571-633.
- Megiorni, F., S. Cialfi, C. Dominici, S. Quattrucci and A. Pizzuti (2011). "Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding." PLoS One **6**(10): e26601.
- Merhautova, J., R. Demlova and O. Slaby (2016). "MicroRNA-Based Therapy in Animal Models of Selected Gastrointestinal Cancers." Front Pharmacol **7**: 329.
- Metcalfe, N. B. and P. Monaghan (2001). "Compensation for a bad start: grow now, pay later?" Trends Ecol Evol **16**(5): 254-260.
- Militello, M., E. M. Pappalardo, S. Ermito, A. Dinatale, A. Cavaliere and S. Carrara (2009). "Obstetric management of IUGR." J Prenat Med **3**(1): 6-9.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogossova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-10518.
- Molinari, F. and M. Frattini (2013). "Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer." Front Oncol **3**: 326.
- Moore, V. M., M. J. Davies, K. J. Willson, A. Worsley and J. S. Robinson (2004). "Dietary composition of pregnant women is related to size of the baby at birth." J Nutr **134**(7): 1820-1826.

- Morrison, C. D. and R. E. Brannigan (2015). "Metabolic syndrome and infertility in men." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **29**(4): 507-515.
- Newbern, D. and M. Freemark (2011). "Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **18**(6): 409-416.
- Nwagwu, M. O., A. Cook and S. C. Langley-Evans (2000). "Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero." Br J Nutr **83**(1): 79-85.
- O'Rahilly, R. (1987). "Human embryo." Nature **329**(6138): 385.
- O'Rahilly, R. and F. Muller (2010). "Developmental stages in human embryos: revised and new measurements." Cells Tissues Organs **192**(2): 73-84.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-257.
- Ong, K. K., M. L. Ahmed, P. M. Emmett, M. A. Preece and D. B. Dunger (2000). "Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study." BMJ **320**(7240): 967-971.
- Orozco-Solis, R., S. Lopes de Souza, R. J. Barbosa Matos, I. Grit, J. Le Bloch, P. Nguyen, R. Manhaes de Castro and F. Bolanos-Jimenez (2009). "Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding." Physiol Behav **96**(3): 481-492.
- Oscai, L. B. and J. A. McGarr (1978). "Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat." Am J Physiol **235**(3): R141-144.
- Ozanne, S. E., G. S. Olsen, L. L. Hansen, K. J. Tingey, B. T. Nave, C. L. Wang, K. Hartil, C. J. Petry, A. J. Buckley and L. Mosthaf-Seedorf (2003). "Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle." J Endocrinol **177**(2): 235-241.
- Ozanne, S. E., G. D. Smith, J. Tikerpae and C. N. Hales (1996). "Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams." Am J Physiol **270**(4 Pt 1): E559-564.
- Park, J. H., D. A. Stoffers, R. D. Nicholls and R. A. Simmons (2008). "Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1." J Clin Invest **118**(6): 2316-2324.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-89.
- Petrik, J., B. Reusens, E. Arany, C. Remacle, C. Coelho, J. J. Hoet and D. J. Hill (1999). "A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II." Endocrinology **140**(10): 4861-4873.
- Plagemann, A., T. Harder, M. Brunn, A. Harder, K. Roepke, M. Wittrock-Staar, T. Ziska, K. Schellong, E. Rodekamp, K. Melchior and J. W. Dudenhausen (2009). "Hypothalamic proopiomelanocortin

- promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome." J Physiol **587**(Pt 20): 4963-4976.
- Plagemann, A., I. Heidrich, F. Gotz, W. Rohde and G. Dorner (1992). "Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding." Exp Clin Endocrinol **99**(3): 154-158.
- Plagemann, A., K. Roepke, T. Harder, M. Brunn, A. Harder, M. Wittrock-Staar, T. Ziska, K. Schellong, E. Rodekamp, K. Melchior and J. W. Dudenhausen (2010). "Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding." J Perinat Med **38**(4): 393-400.
- Platz, E. and R. Newman (2008). "Diagnosis of IUGR: traditional biometry." Semin Perinatol **32**(3): 140-147.
- Portela, A. and M. Esteller (2010). "Epigenetic modifications and human disease." Nat Biotechnol **28**(10): 1057-1068.
- Powell-Braxton, L., P. Hollingshead, C. Warburton, M. Dowd, S. Pitts-Meek, D. Dalton, N. Gillett and T. A. Stewart (1993). "IGF-I is required for normal embryonic growth in mice." Genes Dev **7**(12B): 2609-2617.
- Qian, Y. Y., Z. S. Liu, Z. Zhang, A. S. Levenson and K. Li (2018). "Pterostilbene increases PTEN expression through the targeted downregulation of microRNA-19a in hepatocellular carcinoma." Mol Med Rep **17**(4): 5193-5201.
- Ramakrishnan, U., F. Grant, T. Goldenberg, A. Zongrone and R. Martorell (2012). "Effect of women's nutrition before and during early pregnancy on maternal and infant outcomes: a systematic review." Paediatr Perinat Epidemiol **26 Suppl 1**: 285-301.
- Ramlau-Hansen, C. H., A. M. Thulstrup, E. A. Nohr, J. P. Bonde, T. I. Sorensen and J. Olsen (2007). "Subfecundity in overweight and obese couples." Hum Reprod **22**(6): 1634-1637.
- Ravelli, A. C., J. H. van der Meulen, R. P. Michels, C. Osmond, D. J. Barker, C. N. Hales and O. P. Bleker (1998). "Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine." Lancet **351**(9097): 173-177.
- Raychaudhuri, N., S. Raychaudhuri, M. Thamocharan and S. U. Devaskar (2008). "Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring." J Biol Chem **283**(20): 13611-13626.
- Regnault, N., B. Salanave, K. Castetbon, E. Cosson, A. Vambergue, Y. Barry, S. Fosse-Edorh and M. Vernay (2016). "Diabète gestationnel en France en 2012 : dépistage, prévalence et modalités de prise en charge pendant la grossesse." Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire(9): 164-173.
- Reinisch, J. M., N. G. Simon, W. G. Karow and R. Gandelman (1978). "Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth." Science **202**(4366): 436-438.
- Roseboom, T., S. de Rooij and R. Painter (2006). "The Dutch famine and its long-term consequences for adult health." Early Hum Dev **82**(8): 485-491.

- Roseboom, T. J., J. H. van der Meulen, G. A. van Montfrans, A. C. Ravelli, C. Osmond, D. J. Barker and O. P. Bleker (2001). "Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life." J Hypertens **19**(1): 29-34.
- Rosenberg, A. (2008). "The IUGR newborn." Semin Perinatol **32**(3): 219-224.
- Rosenbloom, A. L. (2007). "Physiologie de la croissance." Annales Nestlé **65**: 99-110.
- Rosenfeld, R. G. (2003). "Insulin-like growth factors and the basis of growth." N Engl J Med **349**(23): 2184-2186.
- Russell, Z., R. A. Quintero and E. V. Kontopoulos (2007). "Intrauterine growth restriction in monochorionic twins." Semin Fetal Neonatal Med **12**(6): 439-449.
- Russo, F., S. Di Bella, G. Nigita, V. Macca, A. Lagana, R. Giugno, A. Pulvirenti and A. Ferro (2012). "miRandola: extracellular circulating microRNAs database." PLoS One **7**(10): e47786.
- Russo, F., S. Di Bella, F. Vannini, G. Berti, F. Scoyni, H. V. Cook, A. Santos, G. Nigita, V. Bonnici, A. Lagana, F. Geraci, A. Pulvirenti, R. Giugno, F. De Masi, K. Belling, L. J. Jensen, S. Brunak, M. Pellegrini and A. Ferro (2018). "miRandola 2017: a curated knowledge base of non-invasive biomarkers." Nucleic Acids Res **46**(D1): D354-D359.
- Salomon, F., R. C. Cuneo, R. Hesp and P. H. Sonksen (1989). "The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency." N Engl J Med **321**(26): 1797-1803.
- Sandovici, I., N. H. Smith, M. D. Nitert, M. Ackers-Johnson, S. Uribe-Lewis, Y. Ito, R. H. Jones, V. E. Marquez, W. Cairns, M. Tadayyon, L. P. O'Neill, A. Murrell, C. Ling, M. Constanca and S. E. Ozanne (2011). "Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(13): 5449-5454.
- Scholl, T. O. (2005). "Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant." Am J Clin Nutr **81**(5): 1218S-1222S.
- Sermondade, N., C. Faure, L. Fezeu, R. Levy and S. Czernichow (2012). "Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia." Arch Intern Med **172**(5): 440-442.
- Slama, R., O. Thiebaugeorges, V. Goua, L. Aussel, P. Sacco, A. Bohet, A. Forhan, B. Ducot, I. Annesi-Maesano, J. Heinrich, G. Magnin, M. Schweitzer, M. Kaminski and M. A. Charles (2009). "Maternal personal exposure to airborne benzene and intrauterine growth." Environ Health Perspect **117**(8): 1313-1321.
- Snoeck, A., C. Remacle, B. Reusens and J. J. Hoet (1990). "Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas." Biol Neonate **57**(2): 107-118.
- Sohi, G., K. Marchand, A. Revesz, E. Arany and D. B. Hardy (2011). "Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -hydroxylase promoter." Mol Endocrinol **25**(5): 785-798.
- Sonneville, F., M. Ruffin, L. Guillot, N. Rousselet, P. Le Rouzic, H. Corvol and O. Tabary (2015). "New insights about miRNAs in cystic fibrosis." Am J Pathol **185**(4): 897-908.

- Spranger, J., A. Kroke, M. Mohlig, M. M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing and A. F. Pfeiffer (2003). "Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus." *Lancet* **361**(9353): 226-228.
- Stoffers, D. A., B. M. Desai, D. D. DeLeon and R. A. Simmons (2003). "Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat." *Diabetes* **52**(3): 734-740.
- Straus, D. S., G. T. Ooi, C. C. Orłowski and M. M. Rechler (1991). "Expression of the genes for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins-1 and -2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting." *Endocrinology* **128**(1): 518-525.
- Sugden, M. C. and M. J. Holness (2002). "Gender-specific programming of insulin secretion and action." *J Endocrinol* **175**(3): 757-767.
- Tarrade, A., P. Chavatte-Palmer, M. Guillomot, S. Camous and D. Evian-Brion (2014). Le Placenta. *La reproduction animale et humaine*. S. Chastant-Maillard and M. Saint-Dizier: 367–394.
- Tarrade, A., P. Panchenko, C. Junien and A. Gabory (2015). "Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism." *J Exp Biol* **218**(Pt 1): 50-58.
- Thissen, J. P., J. M. Ketelslegers and L. E. Underwood (1994). "Nutritional regulation of the insulin-like growth factors." *Endocr Rev* **15**(1): 80-101.
- Thissen, J. P., L. E. Underwood and J. M. Ketelslegers (1999). "Regulation of insulin-like growth factor-I in starvation and injury." *Nutr Rev* **57**(6): 167-176.
- Valentino, S. A., A. Tarrade, J. Aioun, E. Mourier, C. Richard, M. Dahirel, D. Rousseau-Ralliard, N. Fournier, M. C. Aubriere, M. S. Lallemand, S. Camous, M. Guinot, M. Charlier, E. Aujean, H. Al Adhami, P. H. Fokkens, L. Agier, J. A. Boere, F. R. Cassee, R. Slama and P. Chavatte-Palmer (2016). "Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits." *Part Fibre Toxicol* **13**(1): 39.
- van Straten, E. M., V. W. Bloks, N. C. Huijkman, J. F. Baller, H. van Meer, D. Lutjohann, F. Kuipers and T. Plosch (2010). "The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**(2): R275-282.
- Ventimiglia, E., P. Capogrosso, M. Colicchia, L. Boeri, A. Serino, G. Castagna, M. C. Clementi, G. La Croce, C. Regina, M. Bianchi, V. Mirone, R. Damiano, F. Montorsi and A. Salonia (2016). "Metabolic syndrome in white European men presenting for primary couple's infertility: investigation of the clinical and reproductive burden." *Andrology* **4**(5): 944-951.
- Vermeulen, M., K. W. Mulder, S. Denissov, W. W. Pijnappel, F. M. van Schaik, R. A. Varier, M. P. Baltissen, H. G. Stunnenberg, M. Mann and H. T. Timmers (2007). "Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4." *Cell* **131**(1): 58-69.
- Vickers, M. H., B. H. Breier, W. S. Cutfield, P. L. Hofman and P. D. Gluckman (2000). "Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**(1): E83-87.

- Vickers, M. H., B. A. Ikenasio and B. H. Breier (2001). "IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming." Endocrinology **142**(9): 3964-3973.
- Vickers, M. H., B. A. Ikenasio and B. H. Breier (2002). "Adult growth hormone treatment reduces hypertension and obesity induced by an adverse prenatal environment." J Endocrinol **175**(3): 615-623.
- Vogt, M. C., L. Paeger, S. Hess, S. M. Steculorum, M. Awazawa, B. Hampel, S. Neupert, H. T. Nicholls, J. Mauer, A. C. Hausen, R. Predel, P. Kloppenburg, T. L. Horvath and J. C. Bruning (2014). "Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding." Cell **156**(3): 495-509.
- Waddington, C. H. (2012). "The epigenotype. 1942." Int J Epidemiol **41**(1): 10-13.
- Wang, Z., C. Zang, J. A. Rosenfeld, D. E. Schones, A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, W. Peng, M. Q. Zhang and K. Zhao (2008). "Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome." Nat Genet **40**(7): 897-903.
- Waterland, R. A. and R. L. Jirtle (2004). "Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases." Nutrition **20**(1): 63-68.
- Watkins, A. J., E. S. Lucas, A. Wilkins, F. R. Cagampang and T. P. Fleming (2011). "Maternal periconceptual and gestational low protein diet affects mouse offspring growth, cardiovascular and adipose phenotype at 1 year of age." PLoS One **6**(12): e28745.
- Wattez, J. S., F. Delahaye, L. F. Barella, A. Dickes-Coopman, V. Montel, C. Breton, P. Mathias, B. Foligne, J. Lesage and D. Vieau (2014). "Short- and long-term effects of maternal perinatal undernutrition are lowered by cross-fostering during lactation in the male rat." J Dev Orig Health Dis **5**(2): 109-120.
- Wattez, J. S., A. Delmont, M. Bouvet, O. Beseme, S. Goers, F. Delahaye, C. Laborie, J. Lesage, B. Foligne, C. Breton, C. C. Metges, D. Vieau and F. Pinet (2015). "Maternal perinatal undernutrition modifies lactose and serotransferrin in milk: relevance to the programming of metabolic diseases?" Am J Physiol Endocrinol Metab **308**(5): E393-401.
- Weber, J. A., D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. H. Huang, M. J. Lee, D. J. Galas and K. Wang (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem **56**(11): 1733-1741.
- Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-862.
- Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory and S. Diederichs (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nat Cell Biol **11**(3): 228-234.
- Wollmann, H. A. (1998). "Intrauterine growth restriction: definition and etiology." Horm Res **49 Suppl 2**: 1-6.
- Yamada, M., D. Wolfe, G. Han, S. W. French, M. G. Ross and M. Desai (2011). "Early onset of fatty liver in growth-restricted rat fetuses and newborns." Congenit Anom (Kyoto) **51**(4): 167-173.

- Zambrano, E., C. J. Bautista, M. Deas, P. M. Martinez-Samayoa, M. Gonzalez-Zamorano, H. Ledesma, J. Morales, F. Larrea and P. W. Nathanielsz (2006). "A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat." J Physiol **571**(Pt 1): 221-230.
- Zheng, S., M. Rollet and Y. X. Pan (2011). "Maternal protein restriction during pregnancy induces CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBPbeta) expression through the regulation of histone modification at its promoter region in female offspring rat skeletal muscle." Epigenetics **6**(2): 161-170.
- Zhou, Y., B. C. Xu, H. G. Maheshwari, L. He, M. Reed, M. Lozykowski, S. Okada, L. Cataldo, K. Coschigamo, T. E. Wagner, G. Baumann and J. J. Kopchick (1997). "A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse)." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13215-13220.

Abstract

Intra-Uterine Growth Retardation (IUGR) affects around 5% of human births in western countries and is associated with increased risk of cardio-metabolic diseases. Furthermore, previous studies also indicated that changing nutrition during post-natal period could worsen pathologies later on, in agreement with the hypothesis of Developmental Origins of Health and Disease (the DOHaD hypothesis).

During my PhD, I studied mechanisms involved in the programming of adult cardio-metabolic pathologies in mice born with IUGR and determined the impact of different regimens during lactation on appearance of these pathologies. In particular, I investigated epigenetic modifications involved in the development of insulin resistance. To perform this experiment, pregnant mice were fed with a low-protein/iso-caloric diet during their last week of gestation (E15.5). At birth, IUGR newborns were cross-fostered to a normally-fed dam and litter sizes were adjusted to 3, 6 or 10 pups per dam to induce overfeeding, normal feeding or restriction during lactation, respectively. Mice were compared to a Control group, normally fed during both fetal and lactating periods. First, we have shown that our model could reproduce cardio-metabolic alterations observed in Human. Indeed, restriction during lactation can protect IUGR mice from the development of cardio-metabolic pathologies even in old age. In contrast, normal feeding (IUGR-N) or overfeeding (IUGR-O) during lactation exacerbate weight gain from 1 month of age, and induce insulin resistance, accumulation of lipid droplet in liver and arterial hypertension with age. Molecular alteration of AKT phosphorylation in liver of mice were observed before the appearance of insulin resistance. Interestingly, this could be promoted by the permanent decrease in AKT protein levels and this is associated with a decrease in the positive H3K4me3 histone mark in *Akt* promoter, as observed by a ChIP-Sequencing (NGS). Furthermore, an alteration in H3K4me3 levels was also observed in the promoter of microRNA17-92a cluster gene. miR-19a-3p, a member of this cluster, is known to regulate PTEN translation, an AKT inhibitor. Then post-transcriptional regulation of PTEN seems to be altered in adult IUGR-N and IUGR-O male mice. Currently, importance of this microRNA is studied in a human cohort. Our different data reinforce the importance of an adequate nutrition during the early post-natal period for pups born with IUGR to avoid the emergence of cardio-metabolic pathologies in adulthood and indicate potential mechanisms involved that may lead to the set-up of potential predictive biomarkers of metabolic alteration.

Résumé de Thèse

Le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) concerne environ 5% des naissances dans les pays développés et est associé à un risque accru de développer des pathologies cardio-métaboliques à long terme. En accord avec le concept de l'origine développementale de la santé et des pathologies adultes (DOHaD), plusieurs études suggèrent que la nutrition en période post-natale précoce pourrait moduler l'apparition de ces pathologies.

Durant ma thèse, j'ai étudié l'effet de différentes nutritons appliquées de manière transitoire durant la lactation dans l'induction de pathologies cardio-métaboliques adultes sur un modèle murin de RCIU et je me suis intéressée plus particulièrement aux mécanismes épigénétiques pouvant être impliqués dans l'apparition d'une résistance à l'insuline. Pour cela, le laboratoire a développé un modèle de souris nées avec un RCIU induit par un régime hypo-protéique/iso-calorique de la mère durant sa dernière semaine de gestation. A la naissance, les portées ont été normalisées à 3, 6 ou 10 souriceaux par mère afin d'induire respectivement une surnutrition, une nutrition normale ou une restriction alimentaire durant la lactation. J'ai tout d'abord pu montrer que ce modèle reproduit chez les souris mâles de nombreux troubles métaboliques rencontrés chez l'Humain. En effet, la restriction durant la lactation des souriceaux RCIU les protège de l'apparition des pathologies cardio-métaboliques même à un âge avancé. A l'inverse, la nutrition normale (RCIU-N) ou la surnutrition (RCIU-S) durant la lactation des souriceaux RCIU induit un surpoids dès l'âge de 1 mois, puis une résistance à l'insuline, une accumulation de lipides au niveau hépatique et une hypertension artérielle avec l'âge. La résistance à l'insuline est associée à une altération de la phosphorylation d'AKT. Celle-ci pourrait être favorisée par la diminution permanente des taux d'AKT. Cette baisse est associée à une dérégulation épigénétique au niveau des histones, observée *via* un ChIPSeq (NGS) contre la marque associée à la régulation de la transcription, H3K4me3. D'autre part, mes résultats mettent aussi en évidence une augmentation cohérente de l'inhibiteur d'AKT, PTEN, au niveau post-transcriptionnel. Cette dérégulation implique là aussi des mécanismes épigénétiques : en effet, l'analyse du ChIPSeq révèle également une diminution de l'H3K4me3 au niveau des promoteurs de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la maturation des miARNs, ainsi que de certains miARNs. Parmi eux, le miARN19a, dont une des cibles privilégiées connue est PTEN, est diminué. L'importance de ce miARN est en cours d'étude dans une cohorte humaine.

L'ensemble de ces données renforcent l'importance d'une nutrition adéquate pendant la période post-natale précoce pour les petits nés avec un RCIU afin d'éviter l'émergence de pathologies à l'âge adulte et ouvre la possibilité de disposer dans le futur d'un potentiel bio-marqueur prédictif d'une altération métabolique.