



**HAL**  
open science

**Influence de l'alimentation hyperlipidique  
hypercholestérolémique sur l'expression génique  
embryonnaire et le développement de maladies à long  
terme: etudes sur le modèle lapin**

Olivier Picone

► **To cite this version:**

Olivier Picone. Influence de l'alimentation hyperlipidique hypercholestérolémique sur l'expression génique embryonnaire et le développement de maladies à long terme: etudes sur le modèle lapin. Biologie du développement. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T025 . tel-00718829v2

**HAL Id: tel-00718829**

**<https://theses.hal.science/tel-00718829v2>**

Submitted on 18 Jul 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Paris XI**

**Faculté de Médecine Paris Sud**

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCE DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Champ disciplinaire : Biologie de la Reproduction

Ecole Doctorale de rattachement : Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie

Présentée et soutenue publiquement

par

**Olivier PICONE**

Le 14 juin 2011

**Influence de l'alimentation hyperlipidique hypercholestérolémique sur l'expression génique embryonnaire et le développement de maladies à long terme. Etudes sur le modèle lapin.**

Sous la direction de

Dr Pascale Chavatte-Palmer et Dr Véronique Duranthon  
Laboratoire de Biologie de la Reproduction, INRA, Jouy en Josas

Composition du jury

Mme I. Donnay

Rapporteur

Mme I. Luron

Rapporteur

M. V. Tsatsaris

Examineur

M. M. Lombes

Examineur

Mme V. Duranthon

Directeur de Thèse

Mme P. Chavatte-Palmer

Directeur de Thèse



## Remerciements

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Isabelle Huerou-Luron et à Madame Isabelle Donnay pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier Monsieur Vassilis Tsatsaris et Monsieur Marc Lombes de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements à Madame Corinne Cotinot et Monsieur Jean-Paul Renard et pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame Pascale Chavatte-Palmer et Madame Véronique Duranthon, mes directrices de recherche, pour m'avoir conseillé, encouragé et soutenu tout au long de cette thèse. Vous avez accepté d'encadrer un médecin en connaissant d'avance les difficultés que cela engendrerait. Vous m'avez enseigné la rigueur scientifique. Soyez certaines de ma reconnaissance.

Je souhaite remercier vivement Monsieur René Frydman pour m'avoir encouragé et soutenu dans le choix de me lancer dans cette thèse. Vos conseils éclairent quotidiennement mes choix dans la prise en charge des patientes, dans mes choix scientifiques et dans mes choix de carrière. Je suis extrêmement fier et honoré de pouvoir compter parmi vos élèves.

Je souhaite remercier Madame Alexandra Benachi dont le soutien ne m'a jamais fait défaut. Pouvoir travailler avec toi est un immense honneur.

Merci à Organon de m'avoir attribué une bourse m'ayant permis de subsister.

Je tiens à remercier ici tous ceux qui ont permis que ces travaux se réalisent. Toutes ces personnes ont non seulement permis la réalisation technique, mais aussi contribué à la sauvegarde de mon moral. Pour la partie biologie moléculaire, merci à Nathalie Peynot et Catherine Archilla. Pour l'immuno, merci à Tiphaine Aguirre-Lavin, Michèle Dahirel et Nathalie Beaujean. Pour l'échographie, merci à Patrice Laigne dont les compétences dans ce domaine feraient pâlir certains médecins. Merci à Jean-Luc Servely pour l'histologie. Merci à Laurence Gall pour avoir essayé de faire des western blot sur mes embryons et de m'avoir enseigné le recueil d'ovocytes. Pour les manipes sur les lapins, merci à Nathalie Daniel et Michèle Dahirel et à l'équipe de la lapinerie, en particulier Gilbert Boyer.

Michèle, il n'y a pas assez de place ici pour te dire tout ce que je pense, alors simplement : Merci !

Merci à Ann Gael Cordier. Courage « petite sœur ». Je suis convaincu de tes capacités et de tes compétences.

Je ne peux pas oublier tout le personnel de la maternité de l'hôpital Bécclère qui me supporte, dans tous les sens du terme, depuis si longtemps. J'ai une pensée particulière pour Marie Victoire Sénat qui a assuré mes fonctions en plus des siennes pendant que j'étais au labo à temps plein.

Merci à tous mes amis qui me côtoient depuis si longtemps et savent gentiment me remettre les pieds sur terre : Gwen, Cyrille, Julie, Virginie, Matthieu, Natacha, Jérôme, Diane, Karine, Guillaume, Emmanuelle, Laure, Sylvain, Sylvie, Christophe, Thierry, Florence.

Franck, j'aurais tant aimé que tu sois là pour voir ça et pour tout le reste! Je pense à toi quotidiennement.

Je remercie aussi mes parents et mes beaux parents pour leur soutien. J'ai également une pensée pour Philippe, mon Frère bien aimé qui est en train de rédiger sa thèse de musicologie : une thèse peut se terminer un jour, la preuve ! Les chemins de la thèse sont parfois bien plus longs que les chemins de Saint Jacques.

Enfin ce travail n'aurait jamais été possible sans les sacrifices et les efforts consentis par mes enfants, Valentin, Anaïs et Eloïse. Sans votre soutien indéfectible, votre amour (et vos chers amis Bescherelle et Robert...) rien n'aurait été possible. Je n'ai pas de mot pour exprimer ma gratitude.

A Frasquette : merci pour les potions de régénération et l'amélioration de ma vue malgré les DLA nocturnes. Merci pour l'aide sur les runes des parchemins.

**« Quand on a un éléphant à manger, il faut le faire petit morceau par petit morceau »  
VD**

**Et, encore une fois, merci à Cyrano, mon Veil ami.**

Ah ! Je vous reconnais, tous mes vieux ennemis !

Le mensonge ?

*(il frappe de son épée le vide.)*

tiens, tiens ! -ha ! Ha ! Les compromis,

les préjugés, les lâchetés ! ...

*(il frappe.)*

Que je pactise ?

Jamais, jamais ! -ah ! Te voilà, toi, la sottise !

-je sais bien qu'à la fin vous me mettez à bas ;

n'importe : je me bats ! Je me bats ! Je me bats !

**Cyrano de Bergerac, Acte V, Scène 6**

# Sommaire

<b>A.</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>13</b>
<b>1.</b>	<b>L'ORIGINE FŒTALE DES MALADIES DE L'ADULTE (DOHAD).....</b>	<b>17</b>
1.1.	DEFINITION.....	17
1.2.	ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES HUMAINES.....	19
1.3.	ETUDES CHEZ L'ANIMAL.....	25
1.3.1.	<i>Effets d'une alimentation enrichie pendant la gestation.....</i>	<i>25</i>
1.3.2.	<i>Effets d'une modification de l'alimentation en période périconceptionnelle.....</i>	<i>29</i>
1.4.	MECANISMES.....	33
1.4.1.	<i>Epigénétique.....</i>	<i>33</i>
1.4.2.	<i>Différentiation cellulaire.....</i>	<i>37</i>
1.5.	CONCLUSION.....	39
<b>2.</b>	<b>GENERALITES SUR LES ACIDES GRAS, LES LIPIDES ET LE CHOLESTEROL.....</b>	<b>41</b>
2.1.	LES ACIDES GRAS.....	41
2.1.1.	<i>Les acides gras saturés.....</i>	<i>41</i>
2.1.2.	<i>Les acides gras essentiels.....</i>	<i>43</i>
2.2.	LE CHOLESTEROL.....	45
2.3.	LES LIPIDES.....	47
2.3.1.	<i>Absorption des lipides.....</i>	<i>47</i>
2.3.2.	<i>Transport des lipides : Les Lipoprotéines.....</i>	<i>49</i>
2.3.3.	<i>Les chylomicrons (Figure 6).....</i>	<i>49</i>
2.3.4.	<i>Transformation des VLDL en LDL (Figure 7).....</i>	<i>51</i>
2.3.5.	<i>Les HDL.....</i>	<i>53</i>
2.3.6.	<i>Les apolipoprotéines.....</i>	<i>57</i>
2.4.	L'ATHEROSCLEROSE.....	57
2.4.1.	<i>Activation endothéliale.....</i>	<i>59</i>
2.4.2.	<i>Infiltration lipidique.....</i>	<i>59</i>
2.4.3.	<i>Composante inflammatoire.....</i>	<i>59</i>
2.4.4.	<i>Capsule fibreuse.....</i>	<i>61</i>
2.4.5.	<i>Sclérose.....</i>	<i>61</i>
<b>3.</b>	<b>METABOLISME LIPIDIQUE DURANT LA GROSSESSE ET TRANSFERTS TRANS-PLACENTAIRES DES LIPIDES.....</b>	<b>63</b>
3.1.	METABOLISME MATERNEL ET FŒTAL.....	63
3.2.	METABOLISME PLACENTAIRE.....	65
3.3.	METABOLISME LIPIDIQUE PENDANT LA GESTATION DU LAPIN.....	69
3.3.1.	<i>Métabolisme lipidique pendant une gestation normale.....</i>	<i>69</i>
3.3.2.	<i>Métabolisme lipidique pendant une gestation sous régime enrichi (0,2% de cholestérol).....</i>	<i>71</i>
3.3.3.	<i>Métabolisme lipidique du placenta de lapins sous régime enrichi (0,2% de cholestérol).....</i>	<i>73</i>
3.4.	INFLUENCE D'UNE SUPPLEMENTATION EN OMEGA 3 AU COURS DE LA GROSSESSE <sup>86</sup> .....	75
<b>B.</b>	<b>OBJECTIFS, PROJET DE THESE ET ORGANISATION DU TRAVAIL.....</b>	<b>77</b>
<b>C.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES COMMUNS AUX EXPERIENCES 1 ET 2.....</b>	<b>83</b>
<b>1.</b>	<b>ETHIQUE.....</b>	<b>85</b>
<b>2.</b>	<b>CHOIX DU MODELE.....</b>	<b>87</b>
2.1.	LE MODELE ANIMAL IDEAL.....	87
2.1.1.	<i>Rat.....</i>	<i>89</i>
2.1.2.	<i>Souris.....</i>	<i>91</i>
2.1.3.	<i>Porc.....</i>	<i>93</i>
2.1.4.	<i>Lapin.....</i>	<i>95</i>
2.1.5.	<i>Activation du génome embryonnaire.....</i>	<i>103</i>
2.1.6.	<i>Métabolisme embryonnaire.....</i>	<i>107</i>
2.1.7.	<i>Placentation.....</i>	<i>107</i>
2.1.8.	<i>Morphogénèse embryonnaire.....</i>	<i>109</i>
2.1.9.	<i>Suivi échographique anténatal.....</i>	<i>111</i>
2.1.10.	<i>Outils disponibles et expertise du laboratoire.....</i>	<i>113</i>

2.1.11. <i>Le lapin Watanabe</i> .....	115
2.1.12. <i>Conclusion</i> .....	117
<b>3. REGIME</b> .....	<b>119</b>
<b>4. PRELEVEMENTS SANGUINS</b> .....	<b>123</b>
4.1. TECHNIQUE DE PRELEVEMENT .....	123
4.2. METHODES DE DOSAGES DES METABOLITES .....	125
<b>5. SURVEILLANCE FŒTALE : L'ECHOGRAPHIE</b> .....	<b>127</b>
<b>6. AUTOPSIES ET ANALYSE HISTOLOGIQUE DES AORTES</b> .....	<b>129</b>
6.1. EXAMEN POST MORTEM .....	129
6.2. ANALYSE DES AORTES .....	129
<b>7. ANALYSES STATISTIQUES</b> .....	<b>131</b>
<b>D. EXPERIENCE 1 : EFFETS D'UN REGIME ENRICHI EN LIPIDES ET EN CHOLESTEROL HH OU C DEBUTE EN PERIODE PRE PUBERTAIRE SUR LA MERE, L'EXPRESSION DE GENES EMBRYONNAIRES, LE DEVELOPPEMENT FŒTAL ET LA SURVENUE DE MALADIES A LONG TERME</b> .....	<b>133</b>
<b>1. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>135</b>
1.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL (FIGURE 16).....	135
1.2. MESURE DE LA PRESSION ARTERIELLE .....	139
1.3. PROTOCOLE DE SUPER OVULATION ET COLLECTE D'EMBRYONS .....	141
1.4. BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	143
1.4.1. <i>Le réseau dédié</i> .....	143
1.4.2. <i>Analyse du transcriptome par le réseau dédié</i> .....	145
1.4.3. <i>Slot Blot</i> .....	159
1.5. QUANTIFICATION DE L'ARN DE GENES EMBRYONNAIRES .....	165
1.5.1. <i>Extraction de l'ARN</i> .....	165
1.5.2. <i>Reverse Transcription</i> : .....	167
1.5.3. <i>Dessin des amorces ou « primers »</i> .....	169
1.5.4. <i>Constitution des gammes</i> .....	169
1.5.5. <i>PCR</i> .....	173
<b>2. ETUDE IMMUNO HISTOLOGIQUE DES EMBRYONS</b> .....	<b>177</b>
<b>3. RESULTATS DE L'EXPERIENCE 1 (ARTICLE): LE REGIME HYPERLIPIDIQUE HYPERCHOLESTEROLEMIQUE DONNE A DES LAPINE AVANT LA CONCEPTION AFFECTE L'EXPRESSION DE GENES CHEZ L'EMBRYON, INDUIT UN RETARD DE CROISSANCE ET AUGMENTE LA SUSCEPTIBILITE DES DESCENDANTS A L'OBESITE.</b> .....	<b>181</b>
3.1. RESUME DES RESULTATS .....	181
3.2. ARTICLE 1.....	183
3.3. DONNEES COMPLEMENTAIRES DE L'EXPERIENCE 1. ....	197
3.3.1. <i>L'analyse en Slot Blot n'a pas permis de confirmer les résultats du réseau dédié</i> .....	201
3.3.2. <i>L'analyse par qRT-PCR confirme la sur-expression de l'ARN adipophiline par des embryons J2 issus de mères sous régime HH</i> .....	201
3.3.3. <i>L'analyse par qRT-PCR montre que le régime HH n'induit plus de sur-expression de l'adipophiline au stade blastocyste</i> .....	205
3.3.4. <i>L'analyse immuno- histologique montre une plus grande quantité de gouttelettes lipidiques au sein des embryons HH au stade J2 de l'expérience 1</i> .....	209
3.3.5. <i>L'analyse immunohistologique montre la plus grande quantité de gouttelettes lipidiques présentes chez les embryons HH de l'expérience 1 au stade blastocyste</i> .....	211
<b>E. EXPERIENCE 2 : REGIME HH OU C A PARTIR DE 18 SEMAINES APRES LA NAISSANCE, MOMENT DE LA MISE A LA REPRODUCTION</b> .....	<b>213</b>
<b>1. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>215</b>
<b>2. RESULTATS DE L'EXPERIENCE 2: LE REGIME HH DONNE AU MOMENT DE LA MISE A LA REPRODUCTION N'INDUIT PAS DE RETARD DE CROISSANCE INTRA UTERIN MAIS INDUIT DE L'ATHEROSCLEROSE CHEZ LES DESCENDANTS.</b> .....	<b>217</b>
2.1. LE REGIME HH ADMINISTRE A PARTIR DE LA MISE A LA REPRODUCTION INDUIT UNE DYSLIPIDEMIE, DE L'ATHEROSCLEROSE, SANS OBESITE CHEZ LES MERES .....	217

<b>2.2.</b> LE REGIME HH ADMINISTRE A PARTIR DE LA MISE A LA REPRODUCTION N'INDUIT PAS DE RETARD DE CROISSANCE INTRA UTERIN (RCIU) .....	219
<b>2.3.</b> LE REGIME HH A PARTIR DE LA MISE A LA REPRODUCTION INDUIT DES LESIONS AORTIQUES DANS LA DESCENDANCE AU SEVRAGE.....	219
<b>2.4.</b> AU SEVRAGE, IL N'EXISTE PAS DE DIFFERENCE DE POIDS ET IL EXISTE UNE HYPERLIPIDEMIE CHEZ LES LAPEREAUX SOUS MERES HH .....	219
<b>F.</b> <b>RESUME DES RESULTATS</b> .....	<b>221</b>
<b>G.</b> <b>DISCUSSION GLOBALE</b> .....	<b>225</b>
<b>1. DIFFICULTES RENCONTREES</b> .....	<b>227</b>
<b>2. CHOIX DU MODELE</b> .....	<b>231</b>
<b>3. REGIME ALIMENTAIRE</b> .....	<b>233</b>
<b>4. APPORTS DE LA COMPARAISON EXPERIENCE 1- EXPERIENCE 2</b> .....	<b>235</b>
<b>5. EFFETS PHYSIOLOGIQUES DU REGIME</b> .....	<b>241</b>
<b>5.1.</b> EFFETS DES REGIMES SUR LES MERES.....	241
<b>5.2.</b> IMPACT DU REGIME SUR LE DEVELOPPEMENT PLACENTAIRE.....	247
<b>5.3.</b> IMPACT DU REGIME SUR LE DEVELOPPEMENT FETAL.....	251
<b>5.4.</b> EFFET DU REGIME SUR LA CROISSANCE POST NATALE.....	257
<b>5.5.</b> EFFETS DU REGIME SUR LA TENSION ARTERIELLE A L'AGE ADULTE.....	261
<b>5.6.</b> EFFETS DU REGIME SUR L'ATHEROSCLEROSE.....	263
<b>6. EXPRESSION DE L'ADIPOPHILINE</b> .....	<b>269</b>
<b>6.1.</b> ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PAR LA PUCE ADNC DEDIEE ET QRT-PCR.....	269
<b>6.2.</b> IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE .....	273
<b>6.3.</b> FORMATION DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES .....	275
<b>6.4.</b> ADIPOPHILINE DANS LE TROPHOBLASTE ET PLACENTA .....	281
<b>H.</b> <b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>287</b>
<b>I.</b> <b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>293</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>305</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>323</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>335</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>336</b>

## Tables des Figures

Figure 1. Exposition à la famine aux Pays Bas pendant la seconde guerre mondiale, d'après Painter et al <sup>7</sup> .	20
Figure 2. Schéma du métabolisme de l'ALA et du LA.	42
Figure 3. Molécule de Cholestérol.	44
Figure 4. Métabolisme du Cholestérol.	46
Figure 5. Constitution d'une lipoprotéine.	48
Figure 6. Métabolisme des chylomicrons.	50
Figure 7. Transformation plasmatique des VLDL en LDL.	52
Figure 8. Mécanisme de formation des plaques d'athérome : Infiltration des artères par les LDL.	58
Figure 9. Mécanisme de formation des plaques d'athérome : Recrutement des monocytes et inflammation.	60
Figure 10. Evolution en pourcentage des taux de Triglycérides (TG), phospholipides (PL) et acides gras non estérifiés (NEFA) pendant la gestation.	62
Figure 11. Schématisation des échanges d'acides gras trans-placentaire.	68
Figure 12. Evolution des taux de cholestérol, triglycérides et glucose au cours de la gestation.	68
Figure 13. Illustration des différentes étapes de la digestion chez le lapin.	98
Figure 14. Distance phylogénétique entre espèces.	100
Figure 15. Schéma des différents types de placentation.	106
Figure 16. Protocole Expérimental. Expérience 1 : régime HH ou C débuté à 10 semaines, poursuivi jusqu'au sevrage puis régime HH repris à l'âge adulte pour tous les lapins (J176 à J195).	136
Figure 17. Principe d'analyse du transcriptome par criblage différentiel.	142
Figure 18. Illustration des étapes de la RT-PCR globale.	146
Figure 19. Principe de la transcription in vitro.	152
Figure 20. Plasmide pGEM-T Easy (Promega).	170
Figure 21. Illustration de l'instabilité d'une gamme au cours du temps. Exemple de MAPK7.	200
Figure 22. Illustration des profils de gammes obtenus pour l'analyse de l'ARN de l'adipophiline (A) et Luciferase (B).	202
Figure 23. Illustration des CT de sortie des échantillons.	204
Figure 24. Quantification de transcrit de l'Adipophiline à 48h post-coïtum.	206
Figure 25. Quantification du transcrit de l'adipophiline au stade blastocyste.	206
Figure 26. Protocole Expérimental. Expérience 2 : régime HH ou C débuté à 18 semaines, poursuivi jusqu'au sevrage. Pas de suivi à long terme.	214
Figure 27. Mesure par échographie de la vésicule fœtale à J9 et des longueurs embryonnaires à J14 et J21. Il n'existe aucune différence entre les deux groupes HH2 et C2.	218
Figure 28. Suivi du poids des lapereaux jusqu'au sevrage (expérience 2). Echelle de poids en log (g).	218
Figure 29. Bilan biologiques au moment du sevrage.	220
Figure 30. Résumé des mécanismes potentiels de résistance à l'insuline normal dans le muscle squelettique en fin de grossesse et dans le diabète gestationnel de la femme avec interruption des systèmes enzymatiques (croix).	244
Figure 31. Différences physiologiques constatées entre l'expérience 1 et l'expérience 2.	268
Figure 32. Formation des gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique.	274

## Table des Photos

Photo 1. Tractus génital d'une lapine.....	96
Photo 2. Pose du cathéter sur une oreille de lapin.....	124
Photo 3. Préparation de la lapine pour faire l'échographie.....	126
Photo 4. Exemples de clichés d'échographie fœtale de lapine. ....	128
Photo 5. Enregistrement de la tension artérielle dans l'oreille d'une lapine (courbe rouge). .	138
Photo 6. Embryon de lapin au stade Blastocyste (J5,5). Taille réelle 3 à 5mm. ....	140
Photo 7. Embryon de lapin au stade 48hPC : 16-20 cellules. Taille réelle : 0,5mm.....	140
Photo 8. Résultats du slot blot pour l'adipophiline. ....	200
Photo 9. Embryons issus de mères nourries par le régime HH ou C, à J2. ....	208
Photo 10. Embryons issus de mères nourries par le régime HH ou C, à J5. ....	210
Photo 11. Cellule issue d'un embryon du groupe HH et C au stade blastocyste J5, agrandissement de la Photo 10. ....	212
Photo 12. Aortes prélevées au sevrage, expérience 2. Coloration à l'huile rouge. ....	220
Photo 13. Acquisition en mode Triplan Angio 3D du placenta de lapin à J21. ....	254

## Table des Tableaux

Tableau 1. Evolution des taux de triglycérides, Cholestérol, et acides gras tissulaires, et des HDL et LDL plasmatiques chez les lapines. ....	70
Tableau 2. Récapitulatif des principaux avantages et inconvénients des modèles animaux utilisables.....	116
Tableau 3. Gènes présentant un effet régime significatif d'après l'analyse de variance sur les résultats de transcriptomique.....	196
Tableau 4. Expérience 2: Moyennes $\pm$ SEM des concentrations à jeun de: cholestérol total, HDL, triglycérides, insuline et glucose des femelles en fonction de l'âge et du régime. .....	216
Tableau 5. Expérience 2. Issue de la gestation : Nombre de descendant et survie. ....	218
Tableau 6. Comparaison des principaux résultats obtenus avec le régime HH lors des parties communes des expériences 1 et 2. ....	222

## Table des Annexes

Annexe 1: Programmation fœtale des maladies de l'adulte : quelle importance pour la pratique obstétricale ? <sup>13</sup> .....	307
Annexe 2: Nutrition maternelle : incidence sur la fertilité de la descendance et importance de la période périconceptionnelle pour le long terme <sup>223</sup> .....	313

## Liste des abréviations :

AA :	Acide Arachidonique
ACAT :	Acyl Coa Cholesterol Acyl Transferase
ADNc:	Acide DéoxuriboNucléique complémentaire
AGNE :	Acides Gras Non Esterifiés
ALA :	Acide $\alpha$ -linoléinique
AMV:	Avin Myeloblastosis Reverse Transcriptase
ARN:	Acide RiboNucléique
ARNa:	Acide RiboNucléique Antisens
ARNm:	ARN messenger
ATGL :	Adipose Triglyceride Lipase
C :	Contrôle
CAM:	Cellular Adhesion Molecule
CE:	Esters de Cholestérol
CETP:	Cholesterol Ester Transfer Protein
CT:	Cycle Treshold
dATP:	désoxyadénosine triphosphate
dCTP:	désoxycytidine triphosphate
dGTP:	désoxyguanosine triphosphate
DHA :	Acide docosahexaénoïque
dNTP :	Mélange équimolaire de désoxynucléotides
DOHad:	Developmental Origins of Health and Disease
DTT :	Dithithréitol : agent stabilisant les enzymes
dTTP:	désoxythymidine triphosphate
EGA :	Embryonic Gene Activation
EPA :	Acide eicosapentaénoïque
FABP:	Fatty Acid Binding Protein
FAS :	Fatty Acid Syntase
FATP:	Fatty Acid Transport Protein
FGF BP1:	Fibroblast Growth Factor Protein de type 1
FSH:	Follicular Stimulating Hormon
GDGAT:	Di Glycerol Acyl Transferase
GLUT:	Glucose Transporter
HCG:	Hormone Chorionique Gonadotrope
HDL:	High Density Lipoprotein
HF:	High Fat
HH :	Hypercholestérolémique Hyperlipidique
HMG-Co A:	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
IC :	Intervalle de Confiance
IDL:	Intermediate denisity lipoproteins
IL:	Interleukine
IMC:	Index de masse corporelle (Poids/Taille en cm au carré)
INF:	Interferon

LA:	Acide linoléique
LCAT:	Lécithine Cholestérol Acyl-Transferase
LCPUFA	Long Chain Poly Unsaturated Fatty Acid
LDL:	Low density lipoproteins
LH:	Luteinizing Hormon
MAPK7:	Mitogen Activated Protein Kinase 7
MGN:	Mago Nashi-like Protein
MHF:	Maternal High Fat
NCOA1:	Human Nuclear Receptor CO Activator 1
NCP:	Non Collagen Bone associated Protein
NEFA:	Non Esterified Fatty Acid
NZW :	New Zealand White
OA:	Oleic Acid
OLR1:	Oxydized LDL receptor 1
PAPOA	Poly A olymerase alpha
PAT:	Perilipin Adipophilin TIP47
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PHLF:	Pregnancy and Lactation High Fat
PL:	Phospholipides
PPAR:	Peroxisom Proliferator Activated Protein
RCIU:	Retard de Croissance Intra Utérin
RE:	Réticulum Endoplasmique
RR :	Risque Relatif
RT:	Reverse Transcription
RXR:	Retinoid X Receptor
SNAT:	Neutral Amnio Acid Transporter
SR:	Scavenger Receptor
SREBP :	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
TAG:	Tri Acyl Glycérol
TG:	Triglycérides
TLR:	Toll Like Receptor
TME :	Transition Materno Embryonnaire
TNF:	Tumor Necrosis Factor
VLDL:	Very Low Density Lipoproteins
WHHL :	Watanabe Heritable HyperLipidic



## **A. Introduction générale**



Les problèmes de santé liés à l'alimentation hyperlipidique chez l'humain sont en constante progression : l'obésité et les maladies cardiovasculaires touchent des sujets de plus en plus jeunes. Les femmes en âge de procréer sont donc également touchées par cette nutrition trop riche et déséquilibrée. Les données épidémiologiques et expérimentales disponibles indiquent qu'une perturbation de l'environnement fœtal induit chez la descendance une susceptibilité à développer des maladies une fois arrivé à l'âge adulte. Or ces constatations sont essentiellement basés sur des modèles de restriction de nutrition. Notre objectif est donc d'aborder cette problématique par un modèle d'excès d'apports nutritionnels.

Je vais aborder cette problématique par une revue de la littérature des données existantes, humaines et animales avant de faire un rappel sur le métabolisme lipidique et détailler le projet de thèse et les protocoles expérimentaux, basés sur un excès d'apport en lipides et en cholestérol.



# 1. L'origine fœtale des maladies de l'adulte (DOHAD)

## 1.1. Définition

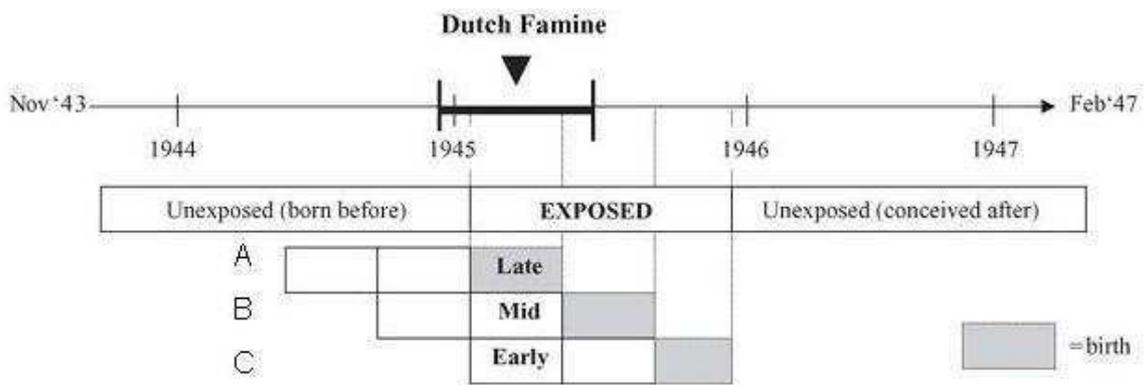
Le concept d'origine fœtale des maladies de l'adulte ou « DOHAD » ([www.mrc.soton.ac.uk/dohad/](http://www.mrc.soton.ac.uk/dohad/)) correspond à l'induction, par une perturbation du développement embryonnaire ou fœtal, d'une prédisposition à développer des maladies métaboliques à l'âge adulte chez le même individu. Cette hypothèse a été faite suite à des études épidémiologiques humaines qui ont permis de démontrer que l'incidence des maladies métaboliques de l'adulte (obésité, hypertension, résistance à l'insuline, syndrome métabolique) est nettement augmentée quand la nutrition maternelle a été perturbée à des périodes critiques du développement fœtal (revus par<sup>1, 2</sup>). Ce phénomène d'importance pour la santé humaine est communément appelé hypothèse de Barker, programmation fœtale, DOHAD ou programmation métabolique. L'hypothèse du phénotype économe, « thrifty phenotype », a été émise par Hales et Barker en 1992<sup>3</sup>. Le fœtus développerai in utero un phénotype d'épargne, d'économie, lié à une insuffisance d'apport. Si en post natal il existe une abondance de nutrition, le fœtus ne serait pas « adapté » à ce milieu et développerai des maladies métaboliques. Un des mécanismes pouvant conduire à cette programmation métabolique est lié au concept de « réponse adaptative prédictive ». Cette hypothèse a été émise par Gluckman et Hanson: les perturbations précoces pourraient induire une « réponse adaptative prédictive » des gènes qui contrôlent le développement, c'est-à-dire que les modifications génétiques ne sont pas immédiatement favorables à la survie, mais seront utiles pendant la période postnatale dans l'environnement prédictif (restreint si l'environnement fœtal est lui-même restreint)<sup>2</sup>. L'apport de substrats est essentiel pour la croissance et le développement de l'embryon, puis du fœtus. Le concept de chaîne d'approvisionnement, ou



« supply line »<sup>4</sup>, met en évidence les différentes fenêtres de susceptibilité pendant lesquelles des perturbations de l'équilibre nutritionnel maternel ou néonatal pourraient entraîner des conséquences à long terme. Les réserves corporelles maternelles, avant même la conception, pourraient influencer la maturation ovocytaire, conditionner l'environnement dans l'oviducte ainsi que les réponses maternelles endocriniennes et métaboliques aux signaux embryonnaires précoces, qui affecteront ensuite le développement embryonnaire.

## **1.2. Etudes épidémiologiques humaines**

Initialement il a été constaté un taux élevé de mortalité infantile au début du XX<sup>e</sup> siècle en Angleterre associé à un taux élevé de décès à l'âge adulte par maladies coronariennes chez les survivants<sup>5</sup>. Cette étude a fait pour la première fois le lien entre les perturbations de l'alimentation, la grossesse, le petit poids de naissance et le développement de maladies à l'âge adulte. Barker et Clark ont montré par l'étude de la cohorte du Hertfordshire (16000 hommes et femmes nés entre 1911 et 1930) que le moment auquel survient la perturbation de la nutrition fœtale induit des effets différents à l'âge adulte. Ainsi ces auteurs ont montré qu'une restriction au premier trimestre induisait un petit poids de naissance, une hypertension artérielle à l'âge adulte puis une prédisposition aux accidents vasculaires cérébraux hémorragiques, alors qu'une restriction au deuxième trimestre induisait en plus un diabète non insulino dépendant et une prédisposition aux maladies coronariennes (et pas d'accident vasculaire cérébral). Au troisième trimestre cela induisait une prédisposition à une hypertension artérielle, une hypercholestérolémie, et une susceptibilité aux maladies coronariennes et aux accidents vasculaires cérébraux, cette fois ischémiques (revue dans<sup>6</sup>). L'étude de la cohorte d'enfants nés après une courte période de famine aux Pays Bas pendant la seconde guerre mondiale<sup>7</sup> montrait aussi un effet différent en fonction du moment de la grossesse auquel est survenue cette famine. La Figure 1 montre le moment de la famine par



**Figure 1. Exposition à la famine aux Pays Bas pendant la seconde guerre mondiale, d'après Painter et al <sup>7</sup>.**

A : Femmes exposées à la famine au dernier trimestre de la grossesse

B : Femmes exposées à la famine au second trimestre de la grossesse

C : Femmes exposées à la famine au premier trimestre de la grossesse

Un rectangle correspond à un trimestre.

rapport à la naissance, le groupe contrôle étant composé des enfants nés avant et après cette période. Neuf cent douze personnes ont été examinées et interrogées à un âge moyen de 50 ans (Figure 1). Les auteurs ont retrouvé plus de maladies coronariennes, d'hyperlipidémie, de perturbations de l'hémostase et d'obésité en cas d'exposition à la famine en début de grossesse, alors que l'exposition en milieu de grossesse induisait plus de maladies respiratoires obstructives et une albuminurie. En cas d'exposition en fin de grossesse, il a été retrouvé plus d'intolérance au glucose<sup>7</sup>. Le point commun de ces études<sup>6, 7</sup> est qu'il y avait des effets marqués de la sous-nutrition au cours de ces périodes, mêmes si ces effets étaient parfois différents voire contradictoires. De plus, une étude récente a montré que l'hypersensibilité et l'inattention des enfants à l'âge de 5 ans ainsi que leur propre obésité étaient liées à l'obésité maternelle avant la conception<sup>8</sup>.

Il a été démontré que le petit poids de naissance était lié à des complications métaboliques à l'âge adulte<sup>9, 10</sup>. Une étude française a montré que les nouveaux nés hypotrophes, une fois devenus adultes et entre l'âge de 22 et 30 ans, avaient tendance à avoir une composition lipidique plus importante et à prendre plus de poids qu'un groupe d'adultes nés eutrophes<sup>11</sup>.

Mais ce petit poids était-il lié à une prématurité induite ou spontanée ou à un réel problème de sous-nutrition fœtale ? Pour répondre à cette question Kjaiser et al ont réalisé une étude portant sur des adultes nés entre 1925 et 1949 en Suède et a démontré que c'était bien le petit poids de naissance, inférieur à -2DS par rapport au poids attendu, qui était lié à la maladie ischémique myocardique, et non à la prématurité<sup>12</sup>. Nous avons effectué une revue de la littérature publiée 2007 destinée aux gynécologues obstétriciens qui reprend ces éléments (Annexe 1)<sup>13</sup>. Par ce travail, nous avons voulu en particulier alerter les obstétriciens dont le rôle de prévention est primordial. En effet, des conseils qu'ils pourront donner et des mesures qu'ils pourront faire appliquer peuvent dépendre la diminution des syndromes métaboliques



des générations suivantes. Depuis que cet article a été publié, de nombreuses études expérimentales animales et épidémiologiques humaines ont conforté ces hypothèses, particulièrement en ce qui concerne la période périconceptionnelle et les régimes alimentaires enrichis.

Des données précieuses sont issues de la cohorte d'Helsinki. Il s'agit du suivi d'enfants nés en Finlande entre 1924 et 1933 et entre 1934 et 1944<sup>14, 15</sup>. Cette étude a démontré que les syndromes dépressifs de l'adulte étaient liés à une prééclampsie maternelle<sup>16</sup>, et que l'anxiété chez l'adulte était liée au poids de naissance et à la rapidité du rattrapage du poids après la naissance<sup>17</sup>. Les enfants nés de mère ayant eu une prééclampsie présentaient également plus de risques d'accident vasculaire cérébral<sup>18, 19</sup>. Le poids de naissance était aussi corrélé avec les perturbations du bilan lipidique à l'âge de 60 ans<sup>20</sup>. L'étude épidémiologique française (Cohorte EDEN, MA Charles) devrait apporter également des informations importantes dans les années à venir. Dans cette étude, l'inclusion des mères a été effectuée avant 20 semaines d'aménorrhée et le suivi des enfants va se poursuivre au moins jusqu'à l'âge de 5 ans. Cette étude a démarré en 2003. Les premières publications font état d'un lien entre l'indice de masse corporelle avant la gestation, le gain de poids pendant la grossesse, les complications obstétricales et le poids de naissance<sup>21, 22</sup>.

L'effet transgénérationnel de ces perturbations a aussi été mis en évidence en particulier l'étude de la cohorte Hollandaise<sup>23</sup>. Dans la cohorte d'enfants nés de mère exposée à la famine in utero, il n'y a pas de diminution du poids de naissance comparé à des témoins, mais une diminution de la taille, donc augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC). Par la suite, ces descendants ont développé plus de problèmes médicaux non cardiovasculaires (maladies infectieuses, maladies neurologiques, auto-immunes...). Il faut noter que toutes ces différences n'existaient que pour les descendants de mères exposées in utero à la famine, et pas pour les descendants de pères exposés in utero à la famine, même si cette dernière cohorte



est beaucoup moins importante<sup>23</sup>. De plus l'âge moyen de la cohorte étudiée est de 32 ans, et il serait intéressant de la réévaluer à un âge plus avancé. Cette transmission transgénérationnelle a également été mise en évidence chez l'animal<sup>24-26</sup>. Il est intéressant de noter qu'une étude épidémiologique humaine (cohorte Hollandaise) a démontré que l'exposition prénatale à la famine était corrélée avec une appétence particulière pour les aliments gras<sup>27</sup>.

Les études humaines évaluant les effets à long terme d'une alimentation enrichie sont inexistantes, alors que ce problème de malnutrition est de plus en plus fréquent. Une des raisons est le caractère relativement récent de cette sorte de troubles nutritionnels et il faudra probablement plusieurs décennies avant que des études sur le devenir à long terme chez l'homme puissent être disponibles. Cependant, des données très importantes existent déjà chez l'animal.

### **1.3. Etudes chez l'animal**

#### **1.3.1. Effets d'une alimentation enrichie pendant la gestation**

Comme nous venons de le voir, l'essentiel des études publiées sur la thématique de programmation fœtale concerne les conséquences d'une restriction alimentaire. Peu d'études se sont penchées sur les conséquences à long terme sur la descendance d'un régime enrichi en lipides donné pendant la gestation, mais, comme revu par Armitage, elles vont toutes dans le même sens : une propension pour la descendance à développer un surpoids et des maladies métaboliques<sup>28</sup>. Un des meilleurs exemples est l'étude de Kahn et al. qui ont démontré en 2003 que le fait de donner un régime enrichi en lipides (du lard) à des rates gestantes induisait dans la descendance une dysfonction de l'endothélium vasculaire<sup>29</sup>. En 2004 ces mêmes auteurs ont utilisé un régime enrichi en lipides débuté au moment de la mise à la reproduction et continué pendant la phase d'allaitement. Ils ont démontré que les rats issus de mères soumises au



régime enrichi pendant la gestation, l'allaitement et ensuite, avaient une fonction endothéliale préservée comparée à des rats ayant eu une mère nourrie avec le régime enrichi uniquement pendant la gestation et l'allaitement, mais étaient hypertendus<sup>30</sup>. Cette expérience montre bien le mécanisme de réponse adaptative prédictive suggéré par Gluckman<sup>31</sup>.

Récemment, Howie et al<sup>32</sup> ont réalisé une étude chez le rat Wistar en donnant un régime alimentaire dit « High Fat » (HF : 45% de l'énergie sous forme lipidique) avant et pendant la gestation puis jusqu'au sevrage (groupe MHF) ou seulement pendant la gestation et jusqu'au sevrage (Groupe PLHF). Ces animaux et leur descendance ont été comparés à un groupe témoin. Après sevrage, les descendants ont reçu soit l'aliment HF, soit l'aliment standard. Il n'y avait pas de différence entre les groupes en ce qui concerne la taille des portées. Cependant, les poids de naissance des descendants étaient significativement plus faibles dans les groupes MHF et PLHF par rapport aux contrôles. A l'âge adulte, ces mêmes rats sont devenus plus gros que les témoins malgré une alimentation normale. En cas d'alimentation HF après le sevrage, tous les rats devenaient plus lourds que les témoins, mais les MHF et PLHF l'étaient encore plus, et ceci était associé à une hyperinsulinémie et une hyperlipidémie. Cette étude a montré que c'est le régime pendant la gestation qui induisait les conséquences à long terme, indépendamment du régime prénatal ou après sevrage<sup>32</sup>.

Samuelson et al. avaient utilisé un régime où était introduit le sucre afin de se rapprocher du régime riche en lipides et en sucre que l'on peut retrouver chez certaines jeunes femmes des pays développés. Le régime utilisé (16% de lipides, 33% de sucre) a été donné pendant la gestation chez la souris. Les souris issues de mères sous régime étaient moins actives, plus lourdes et hyperphages. Les auteurs ont constaté une obésité à prédominance abdominale et une hypertrophie des adipocytes accompagnées d'une hyperinsulinémie et d'une hyperglycémie<sup>33</sup>. De même, chez la souris, les descendants de mère obèse ont développé une hyperphagie et une obésité<sup>34, 35</sup>.



Ces données évoquent les résultats obtenus dans une étude menée chez l'homme (cohorte Hollandaise) dans laquelle Lussana et al. ont démontré que l'exposition prénatale à la famine était corrélée à une appétence particulière pour les aliments gras<sup>27</sup>.

La gestation est certes une période fondamentale pour la nutrition fœtale, mais il existe désormais de nombreux arguments pour penser que les périodes pré et périconceptionnelles sont également des fenêtres de susceptibilité importantes.

### 1.3.2. *Effets d'une modification de l'alimentation en période périconceptionnelle*

McMillen et al. ont publié une revue de la littérature en 2008 dans laquelle les auteurs revenaient sur les résultats des expériences de sous-nutrition préconceptionnelle des brebis<sup>36</sup> : une sous-nutrition importante (70% de diminution des apports) 45 jours (durée de gestation chez la brebis : 146 à 148 jours) avant la conception induisait un retard de croissance intra-utérin, une mise bas prématurée<sup>37</sup> et une hyperactivation de l'axe hypothalamo hypophysaire<sup>36</sup>.

Kwong et al. ont démontré dans un modèle de rat qu'une sous-nutrition protéique très courte, au moment de la période pré-implantatoire (de J0 à J4,5 de développement par rapport à une gestation d'environ 25 jours), induisait une diminution du nombre de cellules du blastocyste et un retard de croissance se traduisant par un poids de naissance réduit<sup>38</sup>.

Watkins et al. ont comparé les effets de deux protocoles de nutrition chez la souris. Dans le premier protocole, des souris ont été nourries avec un régime pauvre en protéines (9% de caséine) entre la mise à la reproduction et l'implantation, ou à partir de la mise à la reproduction jusqu'à la mise bas. Le groupe témoin recevait une alimentation normale pendant toute la durée de l'étude. Dans le groupe de descendants nés d'une mère avec restriction protéique pendant toute la gestation, le poids de naissance était identique aux descendants du groupe témoin<sup>39</sup>.



Par contre, parmi les descendants de mères ayant eu la restriction avant l'implantation, les femelles ont un poids significativement plus important que les témoins<sup>39</sup>. Les descendants des deux groupes de restriction ont des tensions artérielles plus élevées que les témoins<sup>39</sup>. Le même régime isocalorique avec restriction protéique uniquement donné pendant la phase de maturation ovocytaire (régime normal à partir de la mise à la reproduction) n'a pas eu de conséquence de ce régime sur le poids de naissance et la croissance post natale, mais il existait un surcroît d'anxiété, et une hypertension artérielle associée à une diminution de taille des reins et des néphrons dans le groupe sous restriction<sup>40</sup>. Les expériences de Watkins montrent bien qu'une perturbation de l'alimentation a des conséquences importantes sur la descendance, que le régime soit donné uniquement pendant la période de maturation ovocytaire ou pendant la période préimplantatoire.

Le rôle clé de la période périconceptionnelle a également été démontré par Maloney et al. : ces auteurs ont nourri des rates avec un régime déficient en groupements méthyle et acide folique 3 semaines avant la gestation et pendant les 5 premiers jours de gestation. Ce régime donné pendant la phase de maturation ovocytaire et la période préimplantatoire a eu un impact important sur le métabolisme glucidique des descendants, particulièrement chez les mâles qui ont développé une intolérance au glucose<sup>41</sup>.

La méthylation du promoteur d'un gène est le plus souvent associée à la répression du gène cible. Les cytosines de l'ADN peuvent être méthylées par des enzymes appelées ADN méthyl transférase qui interviennent au niveau de sites CpG. Au même titre que la méthylation de l'ADN, les modifications post transcriptionnelles des histones contribuent à la régulation spatio temporelle de l'expression génique. Ces modifications peuvent faire intervenir l'acétylation ou la méthylation qui peuvent toucher différents acides aminés. L'acétylation est souvent corrélée à une ouverture de la chromatine et à l'activation de l'expression des gènes. Le degré de méthylation des histones joue un rôle primordial sur la structure chromatinienne, puisque la monométhylation est souvent associée à un état chromatinien permissif tandis que les formes di- ou tri-méthylées sont globalement reliées à un état répressif.

## **1.4. Mécanismes**

### **1.4.1. Epigénétique**

Les mécanismes mis en jeu dans l'origine fœtale des maladies de l'adulte supposent l'altération de l'expression de gènes clés impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques comme le métabolisme du glucose, l'adipogénèse, la réponse aux corticoïdes et la fonction surrénalienne. Des modifications épigénétiques sont mises en place durant l'ovogénèse et le développement embryonnaire précoce<sup>42-44</sup>. Il a été montré en 2011 que le niveau de méthylation de certains îlots CpG, mesuré sur des prélèvements néonataux sont corrélés avec l'adiposité à l'âge de 9 ans. Une des origines des maladies métaboliques est donc une anomalie épigénétique précoce induite par l'environnement<sup>45</sup>. Les auteurs suggèrent même que le fait de dépister en néonatal ces anomalies de la méthylation pourraient permettre de cibler très tôt une population à risque afin de mettre en place des mesures de prévention, voire des traitements<sup>45</sup>.

La méthylation en position 5 de la cytosine des dinucléotides CpG est la modification épigénétique de l'ADN la plus répandue. Lorsqu'elle survient dans les régions promotrices des gènes, elle inhibe leur expression. Puisqu'elle se transmet de façon stable au travers des mitoses, la méthylation de l'ADN permet notamment de maintenir l'empreinte parentale des quelques dizaines de gènes qui ne doivent être exprimés qu'à partir d'un seul allèle (maternel ou paternel) tout au long de la vie. La prépondérance des îlots CpG dans les séquences répétées du génome (séquences rétrovirales endogènes, séquences LINE) permettrait de le protéger de rétro transpositions inopportunes. Une autre modification épigénétique fréquente est la modification de la structure tridimensionnelle de l'ADN (la méthylation de résidus lysines des histones entraîne la fermeture de la chromatine alors que l'acétylation l'ouvre permettant la transcription).



Les génomes ovocytaires et spermatiques sont tous deux fortement méthylés au moment de la fécondation. Chez la souris, dans les 4 heures après celle-ci, une diminution de la méthylation se produit spécifiquement dans le pronoyau paternel. A partir du stade 2 cellules et le mélange des 2 lots d'ADN, la méthylation des blastomères diminue avec les clivages cellulaires successifs du fait du doublement de la quantité d'ADN. Elle serait due à l'exclusion nucléaire de la DNA méthyl transférase qui assure le maintien de la méthylation lors des phases S. Ainsi, le niveau de méthylation atteint un minimum au stade morula puis il remonte au stade blastocyste grâce à la méthylation préférentielle des cellules de la masse cellulaire interne.

Le lien complexe entre les altérations épigénétiques apparues lors de moments cruciaux du développement (période pré conceptionnelle, phase d'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire développement embryonnaire ...) sous l'influence de l'environnement et la santé à long terme sont mal connus<sup>46, 47</sup>. Selon des données récentes sur les effets de la nutrition ou de facteurs environnementaux, il peut être supposé que l'exposition en période préconceptionnelle peut induire une altération de l'épigénome du conceptus, via des modifications de la méthylation de l'ADN ou des modifications des histones au sein même des gamètes<sup>48-50</sup>. Des altérations épigénétiques peuvent conduire à des changements irréversibles de destinée de cellules souches. Un changement précoce de détermination cellulaire peut modifier le fonctionnement d'un organe et induire in susceptibilité à certaines maladies à l'âge adulte<sup>51</sup>. Ce phénomène peut être accentué par la nutrition pré ou périconceptionnelle.

Certains gènes sont plus susceptibles que d'autres aux variations de l'environnement. Chez la souris, une supplémentation en folates et autres donneurs de méthyle durant la gestation permet de changer le profil d'expression d'allèles sensibles à la méthylation chez la descendance<sup>52-55</sup>.



Chez la brebis, l'administration d'un régime déficient en groupements méthyle (carencé en vitamines B et en folates) durant la semaine qui précède et pendant six jours après la fécondation (date à laquelle les embryons étaient transférés dans des receveuses témoins) induit une hypertension artérielle ainsi qu'un excès de poids et d'adiposité chez les descendants une fois adultes<sup>56, 57</sup>. Dans l'espèce humaine, une sous nutrition, une supplémentation en acide folique, une obésité maternelle sont associés à des modifications épigénétique de la progéniture<sup>57, 58</sup>.

Des modifications épigénétiques liées à l'environnement sont donc à l'origine d'altérations à long terme de l'expression de gènes. Cependant, les données sont peu nombreuses et il n'existe pas à notre connaissance d'évaluation des effets de l'hyperlipidémie sur les modifications épigénétiques embryonnaires ou fœtales<sup>48</sup>. De plus, la méthylation de l'ADN n'est certainement pas le seul mécanisme puisque ce ne sont pas les modifications de la méthylation qui sont responsables des effets transgénérationnels observés chez la souris Agouti (Agouti viable yellow)<sup>53</sup>.

#### 1.4.2. *Différentiation cellulaire*

Les différences structurelles et fonctionnelles observées en fonction du régime maternel reflètent des régulations à court et à long terme de l'expression de gènes multiples. Certains des effets rapportés peuvent provenir d'influences endocrines ou nutritionnelles au moment de la gastrulation, comme les effets sur l'endocytose du sac vitellin rapportés par Watkins et al.<sup>39</sup>. Ainsi, des modifications précoces de cellule précurseur des différents feuilletts pourraient entraîner des effets permanents sur la fonction des organes qui en sont dérivés.



## **1.5. Conclusion**

Même si les données épidémiologiques et expérimentales s'accumulent pour prouver le principe des origines fœtales des maladies de l'adulte (DOHAD), les données publiées explorent essentiellement les conséquences des restrictions alimentaires. Cependant, on peut constater que les données concernant une alimentation enrichie en lipides et en cholestérol sont peu nombreuses alors que dans les pays développés il existe un réel problème de santé publique lié à une alimentation trop riche. En effet, la proportion d'adultes obèses ou hypercholestérolémiques augmente régulièrement. Ainsi la prévalence de l'obésité en France est passée de 8% en 1997 à 13% en 2006<sup>59</sup>, et les femmes enceintes n'échappent pas à ce phénomène.



## **2. Généralités sur les acides gras, les lipides et le cholestérol.**

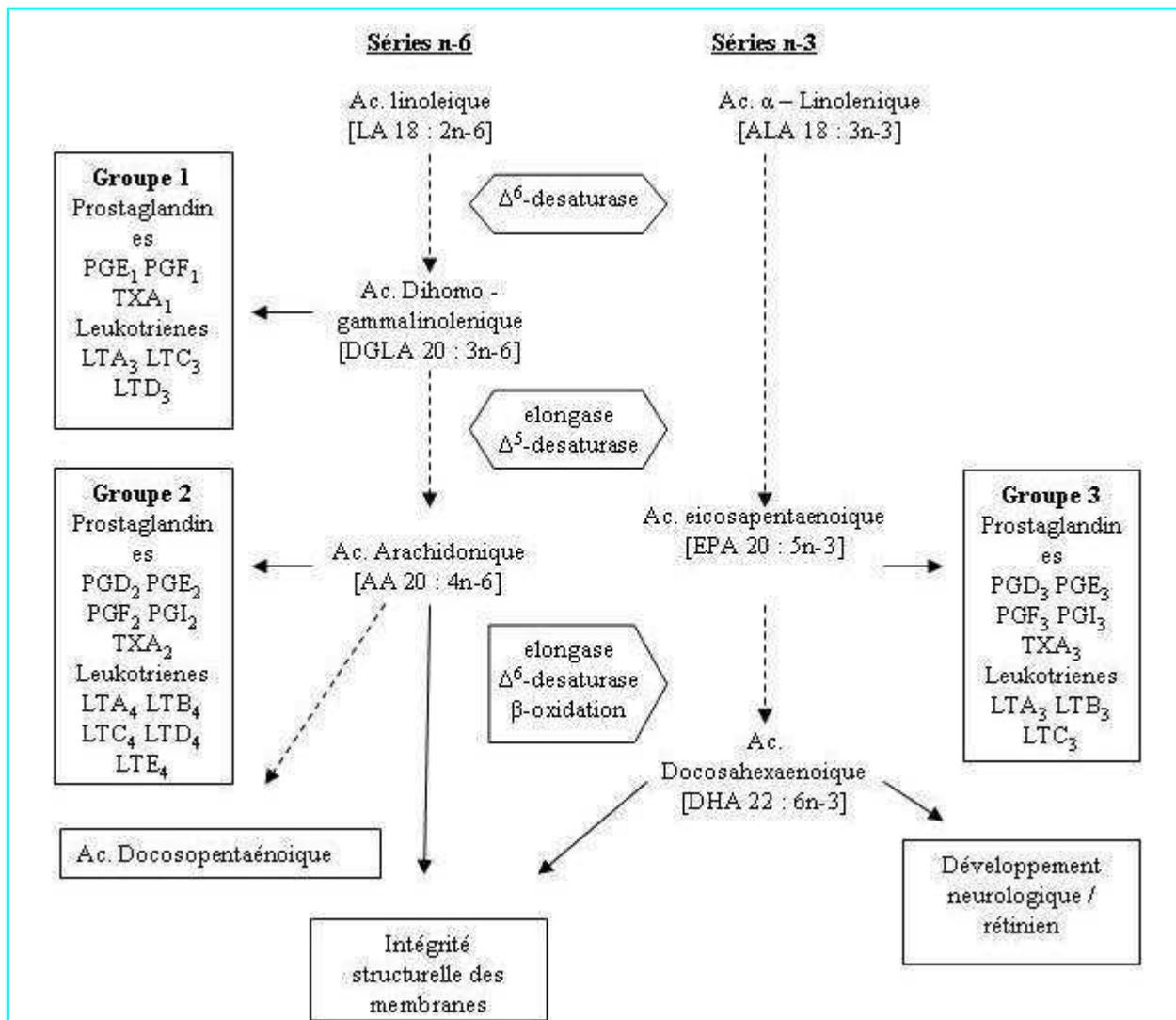
Puisque ce travail de thèse évalue l'effet d'un régime enrichi en lipides et en cholestérol sur le développement, il me semble important de faire un rappel sur les fonctions et le métabolisme de ces éléments.

### **2.1. *Les Acides Gras***

Les acides gras sont classés en deux catégories en fonction de la présence ou non de doubles liaisons : les acides gras saturés et les acides gras insaturés (dont les acides gras essentiels).

#### **2.1.1. *Les acides gras saturés***

Des taux élevés d'acides gras saturés dans l'alimentation sont corrélés avec un plus haut risque d'athérosclérose et de maladie coronaire. Les acides gras saturés « trans » sont issus de l'hydrogénation des acides gras saturés par l'industrie agroalimentaire. Dans la configuration « trans » les groupements sont du même côté de part et d'autre d'une double liaison alors qu'ils sont du côté opposé dans une liaison « cis ». Il en résulte que la configuration géométrique est plutôt droite dans la forme « trans » alors qu'elle est courbée dans la configuration « cis ». La configuration « trans » des acides gras permet de solidifier les lipides, d'où leur utilisation dans l'industrie. Leur rôle délétère est lié au fait que les acides gras trans modifient fortement le ratio LDL/HDL. De manière générale, les acides gras saturés augmentent le taux de LDL (athérogène) sans diminuer le taux de HDL (protecteur)<sup>60</sup>.



**Figure 2. Schéma du métabolisme de l'ALA et du LA.**

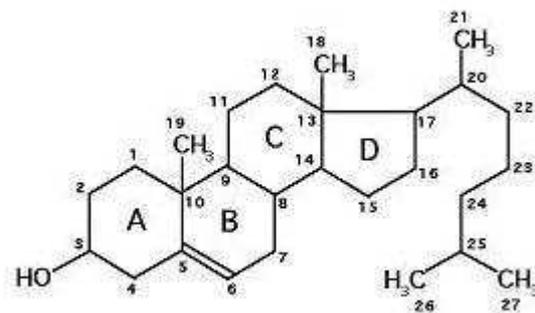
Ce métabolisme nécessite différentes enzymes dont des désaturases et des élongases <sup>61</sup>.

### 2.1.2. *Les acides gras essentiels*

Les acides gras « essentiels » sont polyinsaturés. Ils sont dits essentiels car les précurseurs que sont l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) et l'acide linoléique (LA) ne peuvent être synthétisés par l'organisme. Leur apport par l'alimentation est donc indispensable. Les principaux dérivés de l'ALA sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) et constituent le groupe des oméga 3 (double liaison sur le carbone 3). De même, le LA et ses dérivés à longues chaînes polyinsaturées que sont l'acide dihommogammalinoléique et l'acide arachidonique (AA) constituent le groupe des oméga 6 (double liaison sur le carbone 6).

Les acides gras sont tous source d'énergie. Les acides gras essentiels conduisent, en plus d'être une source d'énergie, d'une part à la synthèse de dérivés à longue chaîne constitutifs de toutes les membranes cellulaires (rôle structural) et d'autre part, à la synthèse de médiateurs bioactifs sous la forme de molécules oxygénées (eicosanoïdes, docosanoïdes....). Les acides gras essentiels et leurs dérivés oxygénés régulent également de multiples voies métaboliques en modulant certains processus de signalisation intracellulaire, ainsi que l'expression de gènes cibles via l'activation spécifique de facteurs de transcription. L'EPA et ses métabolites ont des effets directs sur l'inflammation et la réponse immunitaire.

Le métabolisme de l'ALA et du LA, est schématisé dans ses principales étapes dans la Figure ci-contre (Figure 2)<sup>61</sup>. Les deux familles d'acides gras essentiels ne sont pas interconvertibles, mais elles entrent en compétition pour la voie de désaturation – élongation, ce qui implique un effet de « balance métabolique » entre ces deux familles. En situation d'apports alimentaires équilibrés, la voie de biosynthèse des oméga 6 s'arrête à l'acide arachidonique. Elle se poursuit au-delà lorsque cet apport est déficitaire en oméga 3, conduisant à la synthèse d'acide docosapentaénoïque (22 :5 $\omega$ 6) en compensation de la diminution de synthèse du DHA.



**Figure 3. Molécule de Cholestérol.**

## **2.2. Le Cholestérol**

La synthèse des membranes biologiques dans toutes les cellules nécessite du cholestérol ( Figure 3 ).

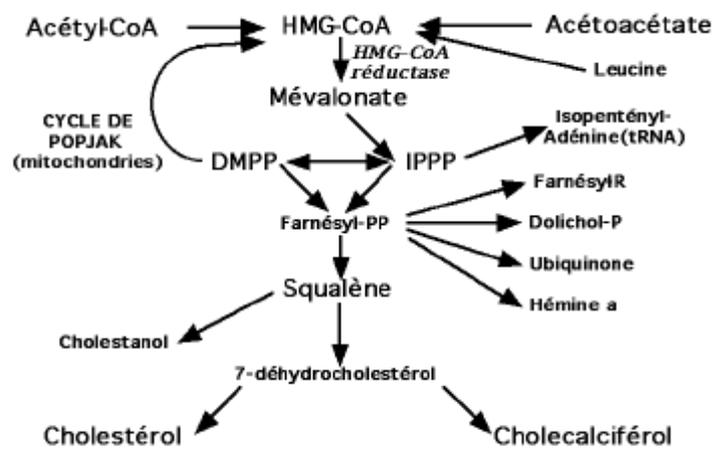
Celui-ci peut être fourni par les lipoprotéines circulantes ou synthétisé dans les cellules par une voie métabolique utilisant l'acétyl-CoA, comme la lipogénèse, dans le cytoplasme.

La synthèse du cholestérol se fait dans le cytoplasme des cellules (en particulier dans l'intestin et le foie) à partir de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) (Figure 4). L'HMG-CoA provient de la condensation de 3 Acétyl-CoA venant des peroxyosomes. Les acides gras à chaînes courtes (C8) et la leucine sont aussi de bons substrats pour la synthèse du cholestérol.

Dans la circulation sanguine, le cholestérol est transporté sous forme libre ou estérifié par les lipoprotéines. Le cholestérol circulant est indispensable pour de nombreuses cellules qui le captent et l'utilisent pour la synthèse de leurs membranes. Le cholestérol des lipoprotéines est aussi le substrat de la synthèse des hormones stéroïdes dans les glandes endocrines ou de la vitamine D dans la peau.

Le transport du cholestérol est assuré par les lipoprotéines : les LDL qui le transportent dans le sang vers les cellules des tissus périphériques, mais aussi les HDL qui le recaptent au niveau de ces cellules pour le rapporter au foie. Son catabolisme est alors contrôlé par la 7 $\alpha$  hydroxylase, enzyme-clé de la transformation du cholestérol en acides biliaires et par le taux de réabsorption des sels biliaires par le cycle entérohépatique.

L'excès de cholestérol dans le sang est à l'origine de dépôts de cholestérol dans la paroi des artères (athérome). Ces plaques d'athérome engendrent une diminution des qualités élastiques des parois artérielles (artériosclérose) qui aboutit à l'obturation d'une artère (infarctus), ou à sa rupture (hémorragie). La régulation du taux du cholestérol sanguin est donc un facteur important de la santé de chaque individu.



**Figure 4. Métabolisme du Cholestérol.**

D'après A. Raisonier « Lipides et lipoprotéines », 2006, Université Paris VI, avec accord de l'auteur.

## **2.3. Les Lipides**

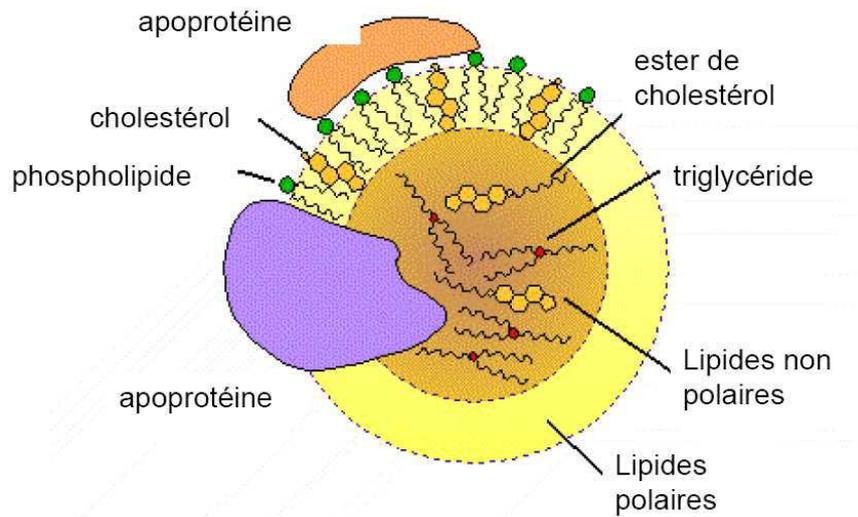
Les lipides constituent une classe de molécules biologiques hydrophobes (graisses ou huiles solubles dans les solvants organiques), constituées d'esters d'acides gras à chaînes moyennes ( $\geq 10$  C), longues ou très longues ( $\geq 20$  C).

### *2.3.1. Absorption des lipides*

Les lipides du chyme (masse alimentaire élaborée dans l'estomac par la digestion) sont hydrolysés dans le duodénum par les enzymes pancréatiques : lipase, phospholipase, cholestérol estérase. L'hydrolyse des lipides nécessite une émulsification en gouttelettes grâce aux sels biliaires. Les sels biliaires sont indispensables à l'action de la lipase pancréatique et de son cofacteur protéique, la colipase.

Les produits de la digestion des lipides sont des monoglycérides, des acides gras, du cholestérol et des lysophospholipides. Ces nutriments sont associés aux sels biliaires sous forme de micelles qui permettent leur absorption par la bordure « en brosse » des entérocytes.

Dans les entérocytes, les lipides sont synthétisés à nouveau à partir du glycérophosphate pour les phospholipides (voie de KENNEDY) et des monoglycérides pour les triglycérides (voie de CLARK et HUBSCHER). Le cholestérol est en partie estérifié dans les entérocytes et en partie réexcrété vers la lumière intestinale. Les chylomicrons sont synthétisés par les entérocytes et sont drainés par les chylifères (vaisseaux lymphatiques qui déversent la lymphe dans le sang veineux).



**Figure 5. Constitution d'une lipoprotéine.**

Les lipoprotéines sont classées en cinq classes selon leur densité et leur composition :

Les chylomicrons

Les VLDL (Lipoprotéine de très faible densité)

Les LDL (Lipoprotéine de faible densité)

Les IDL (Lipoprotéine de densité intermédiaire)

Les HDL (Lipoprotéine de haute densité)

### 2.3.2. *Transport des lipides : Les Lipoprotéines*

Les lipides circulent dans le sang grâce à leurs liaisons à des protéines (les apolipoprotéines) et forment des complexes appelés lipoprotéines. Ainsi les lipoprotéines distribuent les lipides entre leurs sites de synthèse, de stockage, d'utilisation et d'excrétion, en les orientant plus particulièrement vers les cibles cellulaires spécifiques.

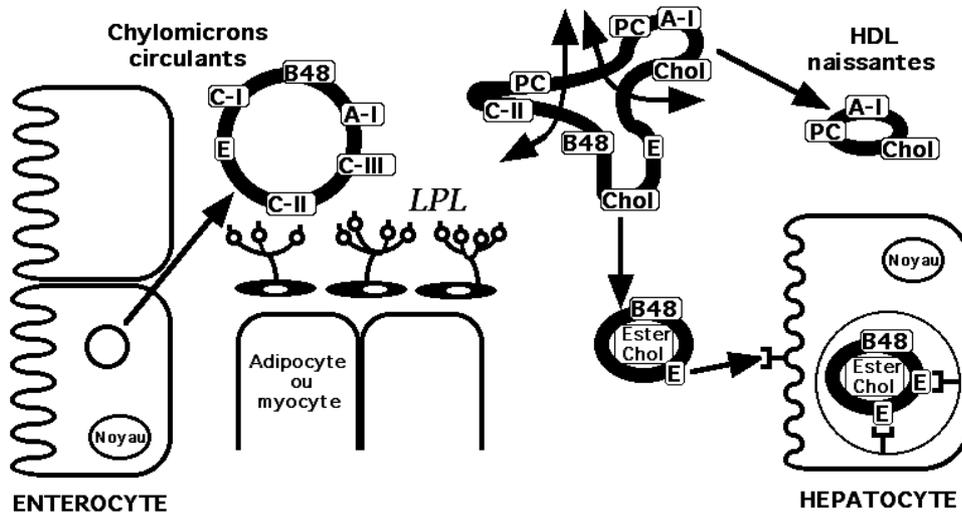
La structure générale d'une lipoprotéine consiste en un noyau lipidique fait de triglycérides et d'esters de cholestérol, entouré par une couche de phospholipides, de cholestérol et d'apoprotéines (Figure 5).

### 2.3.3. *Les chylomicrons (Figure 6)*

Les chylomicrons sont formés dans les cellules de l'intestin à partir des lipides alimentaires. Ce sont des gouttelettes lipidiques de grande taille et riches en triglycérides qui seront source d'acides gras. Les chylomicrons sont synthétisés dans les entérocytes. Ils comprennent une partie centrale riche en triglycérides avec très peu d'esters de cholestérol et une couche superficielle contenant des apolipoprotéines, des phospholipides et du cholestérol libre.

Les chylomicrons sont drainés par les chylifères. Au cours de ce transport la couche superficielle des chylomicrons s'enrichit en apolipoprotéines d'origine hépatique. L'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons crée une déplétion du volume central induisant des déformations. Des replis de la couche périphérique se forment par accolement de zones adjacentes et se détachent dans la circulation sous la forme de disques formés de phospholipides, cholestérol et apolipoprotéines de petite masse (apoC, apoA principalement, cf infra) constituant des HDL naissantes discoïdales ou pré- $\beta$ -HDL. Les édifices résiduels enrichis en apoB48 et E sont reformés autour des esters de cholestérol et des molécules

## Métabolisme des chylomicrons



**Figure 6. Métabolisme des chylomicrons.**

Les chylomicrons sont synthétisés dans les entérocytes avant d'être enrichis en apolipoprotéines au cours de leur transport dans les chylifères. Puis suite à des hydrolyses ils se déforment et sont transformés en des HDL naissantes. D'après A. Raisonier « Lipides et lipoprotéines », 2006, Université Paris VI, avec accord de l'auteur.

Les chylomicrons transportent les lipides du tube digestif vers les hépatocytes et les adipocytes.

restantes de triglycérides. Ces « remnants » de chylomicrons de diamètre très réduit (400 à 600 Å) sont encore appelés  $\beta$ -VLDL intestinales (de densité VLDL, mais de mobilité électrophorétique  $\beta$ ) et sont dégradés par le foie qui les capte grâce à des récepteurs reconnaissant les apoE.

#### 2.3.4. Transformation des VLDL en LDL (Figure 7)

La synthèse des VLDL est réalisée de façon continue par les cellules hépatiques permettant la sécrétion permanente des triglycérides de synthèse endogène. Naturellement cette synthèse augmente considérablement après les repas, pour revenir à un état basal à jeun.

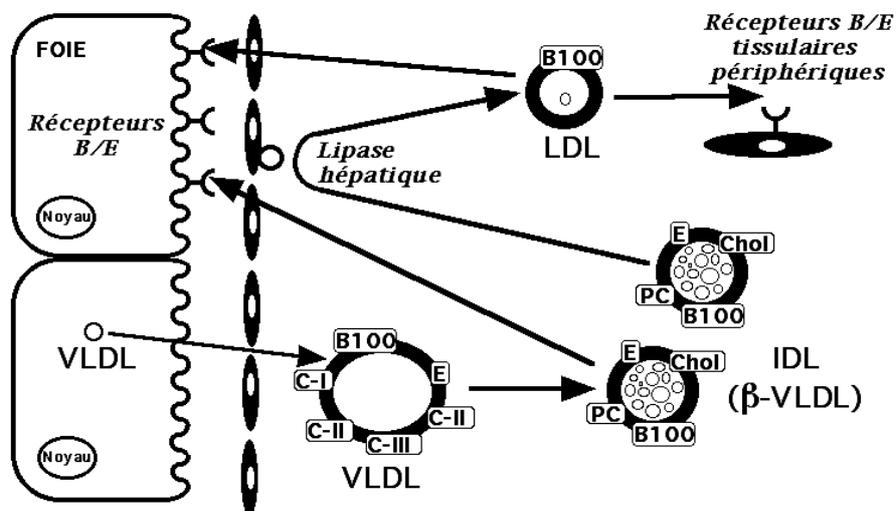
La dégradation plasmatique des VLDL est identique à celle des chylomicrons, dépendante des lipoprotéines lipases. Celles-ci sont activées par les apoC-II présentes à la surface des VLDL et l'hydrolyse des triglycérides assure un apport régulier d'acides gras aux tissus adipeux et musculaire. Des édifices plus petits, enrichis en apoB100 et E, se structurent autour des esters de cholestérol et des molécules restantes de triglycérides. Les « remnants » de VLDL ainsi formés sont des édifices plus petits que les VLDL, appelés IDL ou  $\beta$ -VLDL hépatiques.

Le métabolisme des IDL suit immédiatement celui des VLDL. Deux voies métaboliques peuvent transformer les IDL : la voie des récepteurs, la lipase hépatique.

Une grande quantité des IDL formées est internalisée et dégradée dans le foie via les récepteurs B/E (récepteur LDL) assurant la reconnaissance des apoE sous leur isomorphe normal E3/E3. Ces récepteurs sont distincts des récepteurs précédemment décrits pour le catabolisme des « remnants » de chylomicrons, car ils reconnaissent les apoE et les apoB100.

Une quantité plus faible de particules IDL est dégradée dans la circulation par la lipase hépatique (TLH ou triglycéride lipase hépatique) dont la structure est homologue de celle des LPL mais qui est exclusivement synthétisée par les cellules hépatiques. La lipase hépatique

## Transformation plasmatique des VLDL en LDL



**Figure 7. Transformation plasmatique des VLDL en LDL.**

Les VLDL synthétisés dans le foie. Ils sont dégradés en IDL puis en LDL par la voie des récepteurs hépatiques ou par la lipase hépatique. Ils sont alors captés par les tissus périphériques. D'après A. Raisonier « Lipides et lipoprotéines », 2006, Université Paris VI, avec accord de l'auteur.

Le rôle des VLDL et IDL est de fournir aux tissus des triglycérides (acides gras) en dehors des périodes alimentaires.

permet la transformation des IDL en LDL qui doivent donc être considérées comme des produits terminaux du catabolisme des VLDL et des IDL. Les LDL fournissent le cholestérol aux tissus qui ne peuvent pas en synthétiser pour leurs besoins.

La reconnaissance des LDL par leurs apoB100 se fait au niveau des récepteurs précédemment décrits pour les IDL (récepteur LDL), mais pour les LDL cette captation bien que principalement hépatique, a lieu aussi dans toutes les cellules de l'organisme. La traversée de l'endothélium vasculaire par les LDL initie le processus d'athérosclérose.

### 2.3.5. *Les HDL*

Les HDL ont un rôle complexe : fournir des apoprotéines aux autres lipoprotéines, échanger des lipides avec les autres lipoprotéines, ramener le cholestérol tissulaire au foie.

Les HDL naissantes ont une structure discoïdale composée d'une couche unique repliée sur elle-même, de molécules de phospholipides, de cholestérol et d'apolipoprotéines. L'origine des HDL est mixte, tissulaire et plasmatique :

- le foie sécrète des HDL discoïdales essentiellement composées d'apoE ;
- dans la circulation les replis formés à partir des éléments de surface des chylomicrons et des VLDL, lors de l'hydrolyse des triglycérides, représentent une source importante d'HDL discoïdales contenant principalement des apoA-I et apoC.

Les HDL discoïdales riches en phospholipides peuvent s'enrichir en molécules de cholestérol qu'elles soustraient aux cellules périphériques. Une enzyme plasmatique, la Lécithine Cholestérol Acyl-Transférase (LCAT), estérifie ces molécules excédentaires de cholestérol qui cessent d'appartenir à l'enveloppe périphérique des HDL et migrent au centre des édifices, transformant les HDL discoïdales en HDL3 sphériques. Les HDL3 à leur tour sont capables de capter des molécules de cholestérol membranaire et après nouvelle action de la LCAT se transforment en édifices de plus en plus riches en esters de cholestérol. Les HDL2 ainsi obtenues ont une densité plus légère et un diamètre plus grand que les HDL3.

Les HDL fournissent des apoprotéines aux autres lipoprotéines et ramènent le cholestérol tissulaire au foie.

La captation du cholestérol membranaire par les HDL réalise ce que l'on appelle le transport « reverse » du cholestérol car les HDL2 ainsi formées sont en grande partie reconnues et dégradées dans les cellules hépatiques par l'intermédiaire de récepteurs qui reconnaissent les apoA-I présentes dans la structure des HDL. Le cholestérol ainsi retourné au foie est éliminé dans la bile ou dégradé en acides biliaires.

Dans ce transport « reverse » de cholestérol, seules certaines HDL ne contenant pas d'apoAII mais constituées d'apoA-I, appelées lipoparticules LpA-I, sont capables d'induire ce mouvement du cholestérol hors des cellules.

Une fraction d'HDL2 peut se retransformer en HDL3 sous l'effet cumulé de deux étapes métaboliques. La première de ces étapes est réalisée par un groupe de protéines appelées *Cholesterol Ester Transfer Proteins* (CETP) qui effectue un échange des molécules d'esters de cholestérol des HDL2 par des molécules de triglycérides venant de lipoprotéines riches en triglycérides, essentiellement des VLDL. Cette action a pour effet d'enrichir les HDL2 en triglycérides et les VLDL, en esters de cholestérol.

Dans une deuxième étape la lipase hépatique hydrolyse ces molécules de triglycérides et retransforme les HDL2 en HDL3, édifices de densité plus lourde et de diamètre plus petit.

Il faut noter que si ces transformations apparaissent cycliques, on manque encore de données sur l'importance de ce cycle, et on ne sait pas s'il se produit de façon permanente ou accessoire en fonction des autres événements métaboliques des lipoprotéines, notamment ceux induits par les repas.



### 2.3.6. *Les apolipoprotéines*

Les apolipoprotéines sont des glycoprotéines de masse moléculaire très variable constitutives des lipoprotéines.

Leurs tailles varient de 550000 daltons pour l'apoB100 à 6500 pour l'apoC-I.

— Les apolipoprotéines A-I n'existent à jeun qu'au niveau des HDL où elles représentent 65 % des apolipoprotéines ;

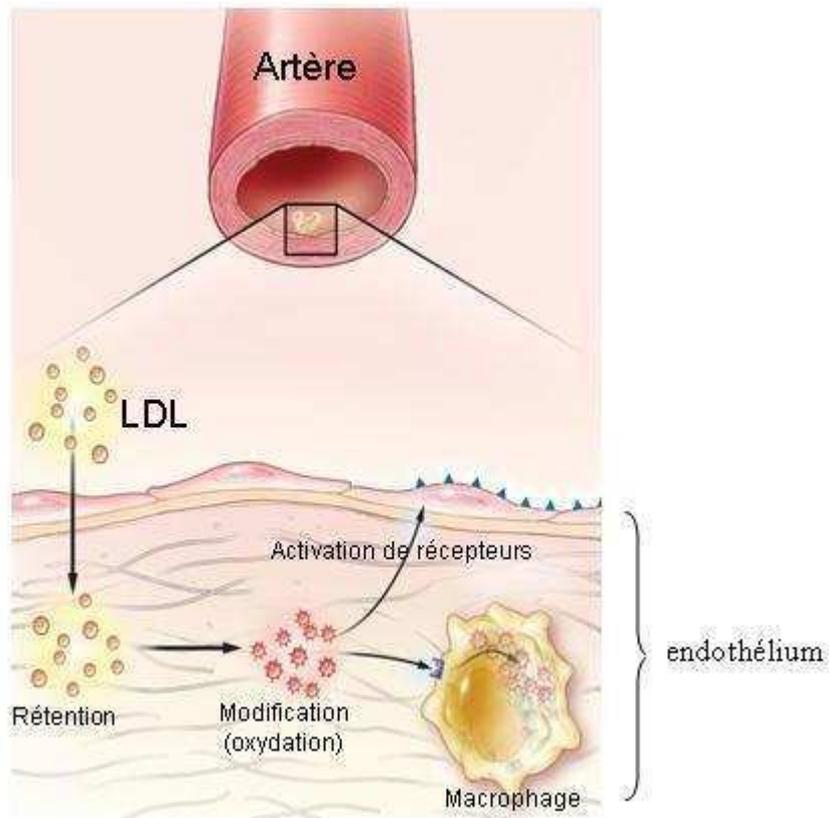
— Les apoB100 se répartissent exclusivement dans les lipoprotéines de basse densité : elles représentent 100 % des apolipoprotéines des LDL et une fraction mineure (30 %) dans les VLDL ;

— Les apoC (C-I, C-II, C-III) et les apoE, se répartissent entre les VLDL, IDL et les HDL ;

— Les chylomicrons sont constitués d'apoA-I, A-II, C, E d'origine hépatique et des apoB48 et apoA-IV d'origine exclusivement intestinale.

## 2.4. *L'athérosclérose*

L'athérosclérose est une maladie déterminée par la constitution de dépôts lipidiques (plaques d'athérome) sur la paroi des artères de gros calibre, qui en réduisent la lumière et leur font perdre leur élasticité. Ces dépôts peuvent aller jusqu'à obstruer des vaisseaux avec nécrose en aval, engendrant des infarctus tissulaires (cœur, cerveau...). Cette pathologie est ainsi à l'origine de la principale cause de mortalité dans les pays développés. La formation de ces plaques est complexe.



**Figure 8. Mécanisme de formation des plaques d'athérome : Infiltration des artères par les LDL.**

Le stress oxydatif et les modifications enzymatiques entraînent une libération de fragments lipidiques toxiques qui vont entraîner l'apparition et l'activation de récepteurs des leucocytes sur les cellules endothéliales. Ces fragments lipidiques sont également captés par des macrophages qui se transforment en cellules spumeuses. (D'après <sup>62</sup>)

#### 2.4.1. *Activation endothéliale*

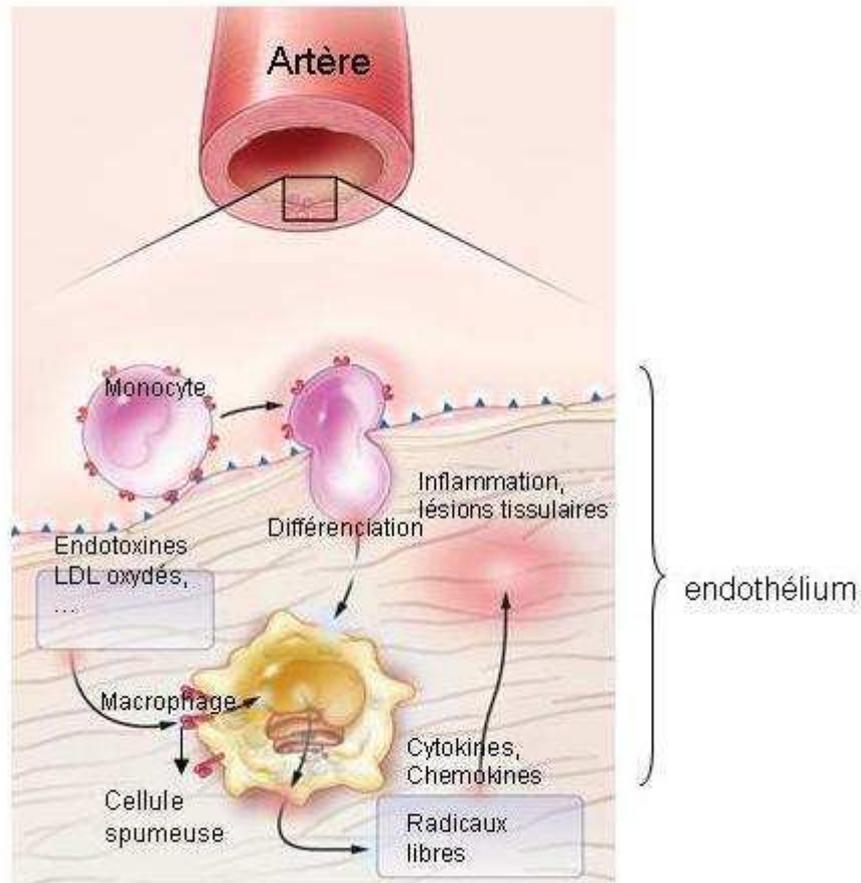
Les turbulences du flux sanguin naturellement présent au niveau des bifurcations artérielles exercent des forces qui activent l'endothélium. Les cellules endothéliales activées expriment alors des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) de la famille des sélectines (E- et P-sélectines) lesquelles favorisent le chimiotactisme des monocytes et lymphocytes sanguins. La paroi soumise aux turbulences perd également ses propriétés athéroprotectrices naturelles, principalement par diminution de la synthèse du monoxyde d'azote (NO)<sup>62</sup>.

#### 2.4.2. *Infiltration lipidique*

L'activation de l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ceci favoriserait l'infiltration de lipides dans l'espace sous-endothélial. Les lipides et les LDL, retenus sous l'effet d'interactions ioniques lipoprotéines / protéines matricielles, subissent alors des modifications oxydatives (oxLDL) et/ou enzymatiques<sup>62</sup>. L'oxydation des LDL est une étape déterminante du processus d'athérogénèse.

#### 2.4.3. *Composante inflammatoire*

L'oxydation des LDL débute par l'attaque des lipides, en particulier polyinsaturés par les radicaux libres intracellulaires. Cette première attaque entraîne une réaction en chaîne qui va aboutir à la dégradation et la libération de fragments lipidiques cytotoxiques dans les tissus. Il y a également formation de peroxydes lipidiques dont l'accumulation est aussi cytotoxique (Figure 8). L'accumulation de LDL dans l'intima induit l'expression de facteurs d'adhésion leucocytaire et de chemokines qui entraînent le recrutement de monocytes et de lymphocytes T. Les monocytes qui dérivent des macrophages expriment à leur tour des



**Figure 9. Mécanisme de formation des plaques d'athérome : Recrutement des monocytes et inflammation.**

Les récepteurs présents sur l'endothélium vont entraîner le recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages qui vont libérer des cytokines et d'autres molécules pro inflammatoires entraînant l'inflammation et la destruction des tissus. D'après <sup>62</sup>.

L'inflammation est une des clés de l'athérogénèse.

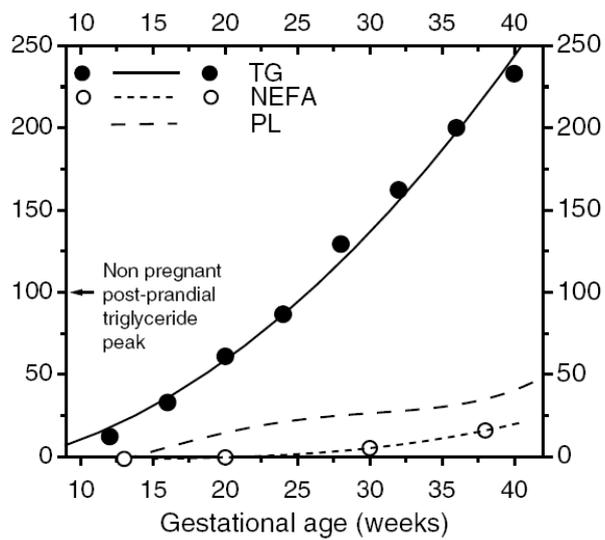
récepteurs (Scavenger Receptors (SR) et Toll Like Receptor (TLR)) qui vont reconnaître et capter des LDL oxydés. Les macrophages activés sécrètent des cytokines chémo-attractives pour les monocytes sanguins et se transforment en cellules spumeuses. Les lymphocytes T, eux aussi recrutés au sein de la plaque, sont stimulés par les macrophages. Ils sécrètent des cytokines de type 1 (IFN $\gamma$ , IL1 et TNF $\beta$ ) qui, de même que l'excès lipidique des cellules spumeuses, déclenchent l'apoptose des macrophages. Un centre nécrotique se constitue. Les médiateurs et les radicaux libres libérés par les macrophages apoptotiques contribuent à l'entretien et à l'amplification de l'inflammation<sup>62</sup>(Figure 9). Cette composante inflammatoire de l'athérosclérose est telle que Hansson et al considèrent que cette maladie est une maladie inflammatoire<sup>63</sup>. Ainsi pour certains auteurs, interférer avec l'inflammation peut être une cible thérapeutique<sup>64, 65</sup>.

#### 2.4.4. *Capsule fibreuse*

L'endothélium activé et les cellules inflammatoires commandent la dédifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires de la *media* en cellules sécrétrices. Elles migrent vers l'*intima* où elles prolifèrent et sécrètent des protéines matricielles, constitutives d'une chape de cellules musculaires lisses et de collagène qui « enkyste » et stabilise la lésion sous formes de plaques<sup>66</sup>.

#### 2.4.5. *Sclérose*

Les plaques peuvent présenter une calcification dystrophique à base d'hydroxyapatite et d'une matrice organique de collagène de type I et de NCPs (Non Collagen Bone-associated Proteins). La calcification rend la plaque rigide, peu déformable et susceptible de se rompre<sup>62, 67</sup>. Au cours de nos expériences, le marquage des plaques d'athérosclérose a été réalisé en utilisant de l'huile rouge (voir Matériel et Méthode). Ce colorant marque spécifiquement les lipides.



**Figure 10. Evolution en pourcentage des taux de Triglycérides (TG), phospholipides (PL) et acides gras non estérifiés (NEFA) pendant la gestation.**

Ce calcul est fait par rapport au taux de base de la femme non enceinte (100 sur les axes d'ordonnées)<sup>68</sup>.

### **3. Métabolisme lipidique durant la grossesse et transferts trans-placentaires des lipides**

La grossesse induit des modifications physiologiques importantes pour que le corps s'adapte à ce nouvel état et permette un développement normal et une croissance fœtale optimale. Le métabolisme lipidique ne fait pas exception : celui-ci évolue pour s'adapter aux besoins maternels et fœtaux qui sont importants quantitativement et qualitativement.

#### **3.1. Métabolisme Maternel et Fœtal**

Le fœtus dépend majoritairement de l'apport maternel pour ses besoins en lipides et le rôle de la lipogenèse fœtale est négligeable. Le fœtus est donc entièrement dépendant de l'apport maternel pour les acides gras à longue chaîne  $\omega 3$  et  $\omega 6$ . Le métabolisme maternel doit donc s'adapter pour répondre aux besoins de l'unité foetoplacentaire. Pendant les deux premiers tiers de la grossesse, l'augmentation du poids maternel correspond essentiellement à l'accumulation de masse adipeuse de réserve. En cas de jeûne, l'activité lipolytique du tissu adipeux est augmentée et les acides gras et le glycérol sont alors métabolisés dans le foie en corps cétoniques et en glucose qui passent aisément la barrière placentaire. Au dernier tiers de la grossesse, l'activité lipolytique est augmentée en réponse aux besoins accrus du fœtus qui accumule plus de 90% des lipides présents à terme dans les 10 dernières semaines de grossesse<sup>68, 69</sup>. Les produits de la lipolyse contribuent à la formation de triglycérides qui sont transférés aux lipoprotéines sanguines. Ainsi les taux plasmatiques de triglycérides, acides gras non estérifiés et phospholipides circulants augmentent régulièrement tout au long de la grossesse (Figure 10).

Le fœtus a également un besoin d'apport en d'acide docohexaénoïque (DHA), en particulier pour son développement cérébral et rétinien.



Les besoins du fœtus en DHA ne peuvent être couverts par l'alimentation maternelle seule chez la plupart des femmes. Une synthèse de novo est possible mais c'est surtout une mobilisation des réserves maternelles qui permet un apport suffisant au fœtus. Le placenta joue un rôle crucial dans la mobilisation des réserves et le transport des acides gras vers le fœtus par une multitude de mécanismes, incluant un transport actif par le syncytiotrophoblaste, un transport intracellulaire et un relargage du côté fœtal. Ce processus de mobilisation et de transport actif permet de pallier un éventuel déficit nutritionnel maternel. Ainsi il serait plus efficace d'adapter l'alimentation maternelle de façon progressive avant la grossesse afin de faire les stocks nécessaires que d'augmenter de façon massive les apports en fin de grossesse<sup>70</sup>.

### **3.2. Métabolisme placentaire**

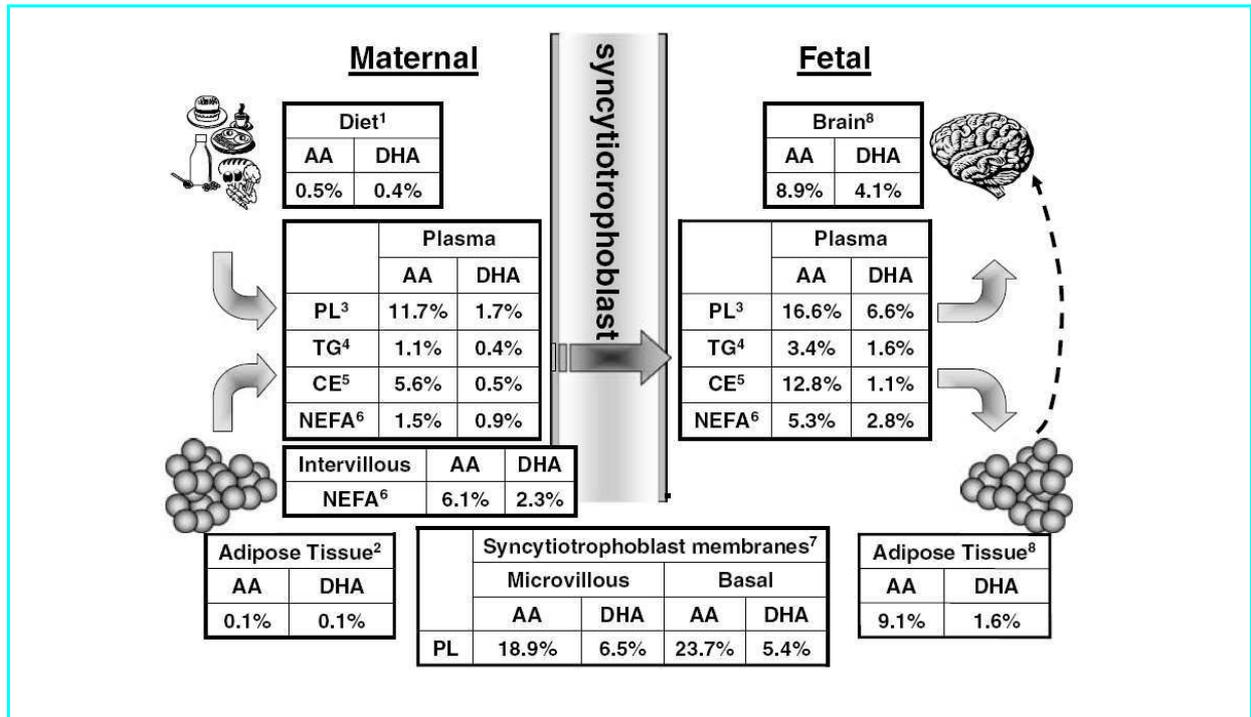
Au niveau de la membrane microvillose la lipoprotéine lipase induit le catabolisme des triglycérides et seuls les acides gras libres sont captés par le placenta. Les acides gras doivent ainsi traverser la membrane microvillose, le syncytium d'une épaisseur d'environ 4 µm puis la membrane basale afin d'atteindre la circulation fœtale. Les acides gras se déplacent au sein des membranes et peuvent changer de position par mécanisme de « flip-flop » transmembranaire<sup>71</sup>. De plus un transfert sélectif des acides gras à longue chaîne existe par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques<sup>68, 69</sup>. En particulier, un certain nombre de FABP (Fatty Acid Binding Proteins) ont été identifiées au niveau du cytoplasme et de la membrane cellulaire qui facilitent le transfert des acides gras. Les transporteurs FATPpm, FAT/CD36 et FATP sont associés à la membrane plasmique et le récepteur p-FATPpm est spécifique à la membrane microvillose du placenta<sup>72</sup>. La protéine jouant un rôle majeur dans le transport de l'acide docosahexaénoïque (DHA) est FATP4 dont l'expression est corrélée au passage transplacentaire actif et préférentiel de cet acide gras<sup>73</sup>.



De plus, l'enrichissement en DHA et AA constaté au niveau du fœtus<sup>69 74</sup> est aussi lié à un transfert préférentiel à travers la membrane microvillositaire<sup>75</sup>.

Le peroxydase proliférateur-activé récepteur gamma (PPAR $\gamma$ ) est une protéine agissant conjointement avec les FATP et l'Adipophiline. PPAR $\gamma$  est très fortement exprimé dans le trophoblaste. Il est impliqué dans la différenciation trophoblastique et permet également d'augmenter la capture des acides gras essentiels : ses ligands sont les acides gras à chaîne intermédiaire et longue, ce qui comprend donc les acides gras essentiels oméga 3 et 6<sup>76</sup>.

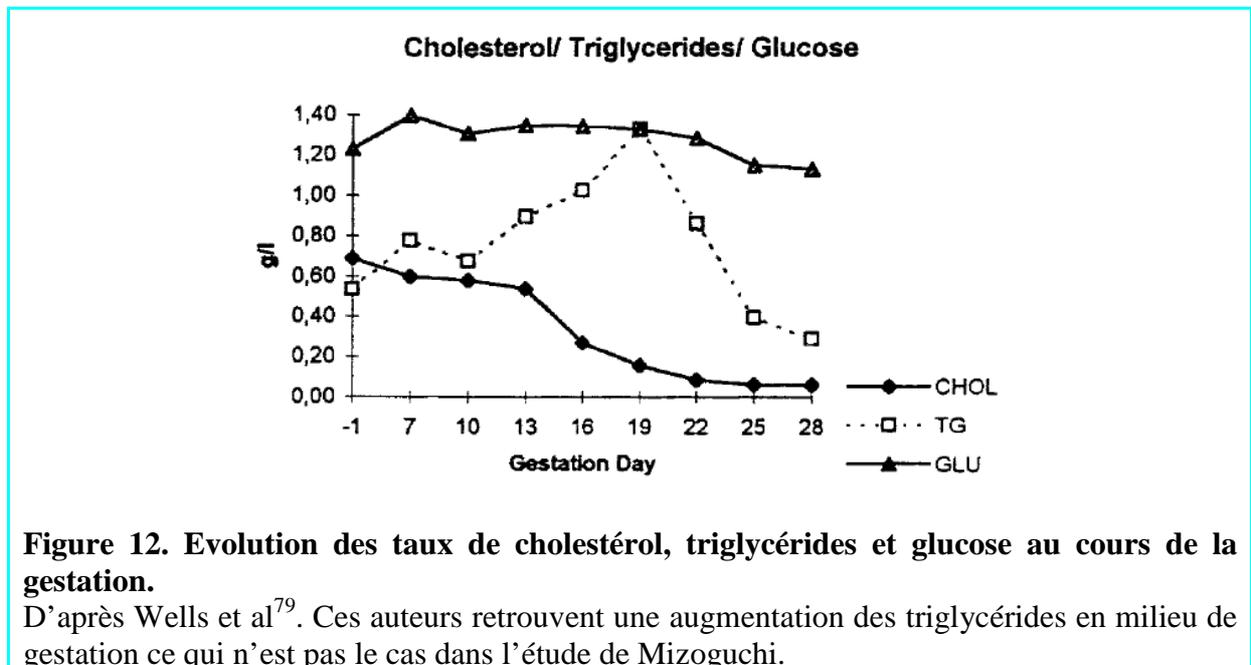
Dans le syncytiotrophoblaste, les acides gras sont soit stockés sous forme de triglycérides, soit oxydés ou métabolisés par le placenta. Les acides gras libres passent la membrane basale par diffusion passive et par transport spécifique pour être couplés à l'albumine dans la circulation fœtale. En raison de la présence de récepteurs sur les deux membranes, les échanges se font dans les deux directions (materno-fœtale et fœto-maternelle)<sup>77, 78</sup> bien que le bilan soit nettement positif pour le fœtus. La figure ci-contre schématise les échanges placentaires d'acides gras chez la femme (Figure 11).



**Figure 11. Schématisation des échanges d'acides gras trans-placentaire.**

Les acides gras sont présents dans le sang et les tissus sous forme estérifiée (Triglycerides (TG), phospholipides (PL), esters de cholestérol (CE) ou sous forme non estérifiée (Acides Gras Non Estérifiés (NEFA)).

AA : acide arachidonique, DHA : acide docoheptaénoïque. Les proportions indiquées sont des pourcentages par rapport aux acides gras totaux, d'après la revue de littérature de Haggarty<sup>70</sup>.



**Figure 12. Evolution des taux de cholestérol, triglycérides et glucose au cours de la gestation.**

D'après Wells et al<sup>79</sup>. Ces auteurs retrouvent une augmentation des triglycérides en milieu de gestation ce qui n'est pas le cas dans l'étude de Mizoguchi.

### **3.3. Métabolisme lipidique pendant la gestation du lapin**

#### **3.3.1. Métabolisme lipidique pendant une gestation normale**

Le taux de cholestérol plasmatique diminue tout au long de la gestation, passant d'un taux de base de  $0,54 \pm 0,12$  g/L à  $0,10 \pm 0,02$  g/L à J28 de gestation. Il en est de même pour le taux de triglycérides qui passe de  $0,45 \pm 0,13$  g/L à  $0,24 \pm 0,06$  g/L<sup>80</sup>. La glycémie subit les mêmes variations ( $7,07 \pm 0,59$  mmol/L avant le coït à  $6,20 \pm 0,73$  mmol/L à J28)<sup>80</sup> ( Figure 12 ). Les tendances sont les mêmes dans l'étude plus ancienne de Montoudis<sup>81</sup>.

L'évolution de la plupart des paramètres biochimiques au cours de la gestation normale est comparable à ce qui peut se voir chez la femme enceinte. Ainsi pour ces auteurs, la lapine est un modèle de choix pour l'évaluation de pathologies gestationnelles et leurs comparaisons avec la femme<sup>80</sup>.

	Lapine non gestante régime standard		Lapine non gestante sous régime enrichi		Lapine gestante régime standard		Lapine gestante sous régime enrichi		Placenta régime standard	Placenta régime enrichi	Lapereau régime standard		Lapereau régime enrichi	
	Plasma	Foie	Plasma	Foie	Plasma	Foie	Plasma	Foie			Plasma	Foie	Plasma	Foie
Triglycérides $\mu\text{g/g}$ tissu		1,1		1,6		6,4		4	2,78	3,51		16,02		13,61
Cholestérol $\mu\text{g/g}$ tissu		2		2,7		0,8		1,8	4,48	0,79		2,67		3,29
Acides Gras Libres $\text{mg/g}$ tissu		2		2,5		2,3		8	4,35	10,42		5,2		9,42
HDL mM	1,14		0,72		0,21		0,69				0,29		0,26	
LDL mM	0,58		7,83		nd		0,87				1,27		2,24	

**Tableau 1. Evolution des taux de triglycérides, Cholestérol, et acides gras tissulaires, et des HDL et LDL plasmatiques chez les lapines.**

Le régime enrichi est à 0,2% de cholestérol. Tableau fait d'après l'article de<sup>82</sup>.

### 3.3.2. Métabolisme lipidique pendant une gestation sous régime enrichi (0,2% de cholestérol).

#### *Dosages lipidiques maternels :*

Montoudis et al. ont montré qu'un régime enrichi avec 0,2% de cholestérol induit à J30 (fin de gestation) une augmentation des taux d'HDL et de cholestérol total chez les mères sans augmentation des LDL ou des acides gras libres<sup>81</sup>.

#### *Métabolisme lipidique hépatique :*

Marseille-Tremblay et al. ont montré que la gestation entraînait une augmentation de la concentration plasmatique des triglycérides sans effet significatif sur les taux d'acides gras libres ou de cholestérol hépatiques. Le régime enrichi en cholestérol pendant la gestation entraîne une plus grande augmentation du taux d'acides gras libres hépatiques. Cependant, le taux de triglycérides hépatiques des mères et des lapereaux décroissait sous régime enrichi<sup>82</sup>.

Les résultats sont résumés dans le Tableau 1.

Montoudis et al.<sup>83</sup> ont observé dans le foie des lapines gestantes à terme, sous régime standard, une réduction de 42% de l'activité de l'ACAT (Acyl Coa Cholesterol Acyl Transferase) et une augmentation de celle de l'HMG Co A reductase de (142.4%), sans modification de celle de la cholestérol-7alpha-hydroxylase. Le régime enrichi n'a pas eu d'influence sur l'activité de l'ACAT hépatique, mais a réduit de façon significative l'activité de l'HMG Co A Reductase et de la cholestérol 7 alpha hydroxylase comparées aux témoins. Le foie des mères compensait l'augmentation des apports en cholestérol en diminuant l'expression de l'HMG Co A reductase<sup>82</sup>. L'expression de la Fatty Acid Synthase (FAS) était diminuée au niveau du foie des mères, mais aussi des lapereaux<sup>82</sup>.



### 3.3.3. Métabolisme lipidique du placenta de lapins sous régime enrichi (0,2% de cholestérol).

Peu d'études ont été publiées pour évaluer le métabolisme lipidique placentaire de la lapine.

Marseille-Tremblay et al. en 2007<sup>82</sup> ont utilisé le régime enrichi à 0,2% de cholestérol utilisé par l'équipe de Montoudis qui induit un retard de croissance d'environ 15% chez les lapereaux<sup>81</sup>. Ces auteurs ont montré que la supplémentation en cholestérol entraîne une augmentation des taux d'acides gras libres et de triglycérides placentaires d'un facteur 2, alors que le cholestérol placentaire est diminué par 5<sup>82</sup> ( Tableau 1 ).

Le régime enrichi augmentait également l'expression des SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins) placentaires, et les isoformes SREBP 1 et 2 ont une translocation nucléaire plus importante chez les animaux soumis à ce régime<sup>82</sup>.

Le régime enrichi entraînait également une augmentation de l'activité de l'HMG Co A reductase placentaire d'environ 43%<sup>83</sup>. Or l'augmentation de l'activité de l'HMG co A Reductase en fin de grossesse en conditions normales n'a pas été retrouvée chez les humains et les babouins suggérant que le métabolisme placentaire du cholestérol chez le lapin est différent de celui des primates<sup>84, 85</sup>.

L'activité de l'ACAT n'a pas été détectée au niveau du placenta et l'activité de la cholestérol 7 alpha hydroxylase n'est pas différente des témoins<sup>83</sup>.

Même si la fonction exacte et les gènes activés par les SREBP ne sont pas bien connus, il semblerait que l'action de ces facteurs de transcription soit très importante, et indépendante de celle de la fatty acid syntase (FAS) et de l'HMG co A Reductase<sup>82</sup>.



### **3.4. *Influence d'une supplémentation en omega 3 au cours de la grossesse*** <sup>86</sup>

Il existe une pression médiatique et agroalimentaire en faveur d'une augmentation des apports en omega 3 dans l'alimentation. Nous avons voulu savoir quelles étaient les données concernant cet apport durant la grossesse. Nous avons ainsi publié en 2009 un article de revue de la littérature sur la question<sup>86</sup>. Force est de constater que si les preuves d'un bénéfice semblent exister chez l'adulte et chez l'animal cela n'est pas le cas chez la femme enceinte. Les études animales suggèrent une tendance en faveur d'une action favorable sur le développement cérébral foetal. La quantité d'omega 3, le rapport omega 3 / omega 6 idéaux ne sont pas déterminés. Il semblerait que la consommation de poisson frais deux fois par semaine soit bénéfique. Si nombreuses études sont donc encore à mettre en place, tant chez l'animal que chez la femme afin de répondre à ces questions, nous n'avons pas abordé cette problématique au cours des travaux présentés ici.



## **B. Objectifs, Projet de thèse et Organisation du travail**



Comme nous venons de le voir dans la première partie de ce mémoire, la thématique de l'origine fœtale des maladies de l'adulte est de toute première importance.

L'objectif de ce travail de Thèse est d'évaluer les conséquences d'une alimentation hypercholestérolémique et hyperlipidique (HH) donnée avant et pendant la gestation sur le développement embryonnaire, fœtal, et la survenue de maladies à long terme.

Ainsi, la première étape de cette thèse a été de choisir le modèle expérimental optimal. Après revue de la littérature notre choix s'est porté sur le modèle lapin et sur un régime enrichi en lipides et en cholestérol (HH).

Au cours d'un premier protocole expérimental (Expérience 1), nous avons voulu d'abord déterminer l'impact physiologique de l'alimentation hypercholestérolémique hyperlipidique donné avant et pendant la gestation. Pour cela nous avons mis en place un régime enrichi à partir de l'âge de 10 semaines, et mis les lapines à la reproduction à 18 semaines. L'équipe de Montoudis avait montré qu'un régime enrichi en cholestérol pouvait être à l'origine d'un petit poids de naissance, mais il n'existait aucune donnée concernant la période prénatale et ils n'avaient pas non plus décrit l'évolution post natale de la croissance<sup>81</sup>. Nous avons donc réalisé une surveillance échographique de la croissance des fœtus puis une surveillance post natale prolongée jusqu'à l'âge adulte du poids, de la tension artérielle et du bilan biologique. Ceci est particulièrement original car n'avait jamais été fait.

Du fait des phénotypes observés il nous est apparu que la période pré et péri conceptionnelle est déterminante puisque les anomalies surviennent très tôt au cours du développement. Nous avons voulu savoir s'il existait une modification de l'expression de gènes à J2, au moment de l'activation de la transcription embryonnaire chez le lapin. Pour cela, nous avons utilisé un réseau d'ADNc disponible dans notre laboratoire et dédié au développement embryonnaire chez le lapin pour rechercher des gènes différenciellement exprimés.



Cette première partie a fait l'objet d'une publication jointe in extenso à ce manuscrit.

Je vais présenter ensuite des données non encore publiées issues du même protocole expérimental : la mise en évidence de la surexpression de l'ARNm de l'adipophiline lors de la TME nous a amené à étudier l'expression de ce gène dans la suite du développement embryonnaire (J5,5, stade blastocyste). Nous avons ensuite voulu déterminer la localisation cellulaire de l'adipophiline au sein des embryons à deux moments différents du développement, à J2 et J5, par une approche immunohistologique.

Nous avons également fait un protocole expérimental très proche du précédent mais en débutant l'alimentation HH au moment de la mise à la reproduction (Expérience 2). Ceci nous permet de connaître l'influence respective de l'alimentation HH au cours de deux périodes (avant et pendant la gestation) sur le développement.

Je vais détailler dans un premier temps les matériels et méthodes communs aux expériences 1 et 2. Je présenterai dans un second temps les expériences 1 et 2 en précisant alors leurs matériels et méthodes spécifiques. Enfin, je ferai une discussion globale de l'ensemble des résultats, suivie de mes conclusions et des perspectives.



## **C. Matériels et Méthodes communs aux expériences 1 et 2**



Une grande partie de la façon dont nous avons procédé est décrite dans l'article que nous avons publié<sup>87</sup>. Cependant, ce format ne permet pas de rendre compte de certains détails. Le chapitre suivant permet ainsi d'apporter des renseignements précieux sur la façon dont ont été conduites les expérimentations.

## **1. Ethique**

Si l'Homme utilise les animaux à des fins expérimentales il doit s'efforcer de respecter certaines règles essentielles dont « l'absence de douleur et de peur ». Il convient donc d'organiser la recherche animale avec le respect de la règle des « 3R » : « Réduction, Remplacement, Raffinement ».

« Remplacement » consiste à remplacer tant que faire se peut l'animal par une méthode alternative. Ceci n'est pas possible pour notre problématique où nous étudions la gestation.

« Réduction » consiste à essayer de diminuer le nombre d'animaux utilisés.

« Raffinement » correspond à la diminution de la souffrance animale : diminuer la gravité des interventions chez l'animal, lutter contre la douleur, contre la peur, l'inconfort. Ce terme peut également se référer au raffinement du questionnement pour être sûr de répondre à la question posée.

Toutes les expérimentations ont été faites en accord avec les « International guiding principles for biomedical research involving animals » publiées par la « Society for the study of reproduction » et également en accord avec le « European Convention on animal experimentation ». Les chercheurs travaillant directement avec les animaux sont titulaires de l'autorisation délivrée par les services vétérinaires. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité scientifique et éthique local (Protocole QuPro86).

Critères de choix généraux d'un modèle animal :

Taille (petit mais suffisamment grand pour permettre les études physiologiques et métaboliques)

Docilité, maniabilité, contention

Elevage et hébergement facile

Génétique connue

Homologies fiables avec les maladies humaines

Analogies avec l'homme aux niveaux anatomique, physiologique, métabolique et physiopathologique

Disponibilité des lignées

Dans le cas d'études pharmacologiques : corrélation pharmacocinétique entre l'homme et l'animal

Coût

## **2. Choix du modèle**

### **2.1. *Le modèle animal idéal***

De façon générale, la recherche chez l'Homme est limitée par l'impossibilité d'expérimentation pour des raisons éthiques et pratiques évidentes. La culture cellulaire permet de répondre aux hypothèses mécanistiques mais ne permet pas de reproduire la complexité physiopathologique des maladies, limitant l'étendue des hypothèses testables. En conséquence, le modèle animal offre une alternative qui permet de reproduire un évènement physiopathologique, de contrôler certaines variables et d'obtenir des données statistiques dans un court laps de temps<sup>88</sup>. Pour les conséquences des anomalies du métabolisme lipidique et l'athérosclérose, l'étude comparée des modèles animaux de maladies humaines aide à comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogénie de ces maladies et fournit des outils de développement de stratégies curatives<sup>89</sup>. Cependant, le modèle animal idéal n'existant pas<sup>88</sup>, le choix du modèle dépend de nombreux paramètres, dont le premier est la ressemblance physiologique entre l'animal et l'homme pour les phénomènes étudiés<sup>88, 90, 91</sup>.

Dans le cadre de cette thèse, il fallait choisir un animal présentant un métabolisme lipidique et des caractéristiques de physiologie de gestation comparables à l'Homme. La présence de cholestérol dans le régime, visant à induire une athérosclérose, était aussi un critère important.

Dans ce chapitre, nous présentons les différents modèles animaux expérimentaux disponibles, en présentant en particulier les caractéristiques de leur métabolisme lipidique et la possibilité ou non d'induire dans ces espèces des lésions d'athérosclérose. Nous finirons par le modèle choisi pour cette thèse, le lapin dont la physiologie est décrite en détail.

Inconvénients du modèle rat :

Métabolisme lipidique différent, résistance à l'athérosclérose

Petite taille ne permettant pas la surveillance échographique avec les appareils dont nous disposons

Mise en route du génome embryonnaire et Métabolisme embryonnaire différent de celui de l'homme (cf infra)

### 2.1.1. *Rat*

Les relations continues entre rats et hommes reflètent une réalité commensale sous-jacente, les rats ayant colonisé le monde suivant le même schéma que les hommes. Les rats sont proches de l'homme car sociaux, très adaptatifs, omnivores, de même qu'ayant un métabolisme et une physiologie comparables. Le rat de laboratoire est un pilier de la recherche physiologique et métabolique depuis la création de la première lignée à l'institut Wistar dans les années 1920<sup>92</sup>. Cependant il existe des différences significatives entre le métabolisme des lipoprotéines du rat et celui de l'homme. L'élimination des chylomicrons et des VLDL circulants est particulièrement efficace chez le rat<sup>93</sup>. En effet, le rat normal est résistant à l'athérosclérose, ce qui a conduit à l'idée qu'il n'était pas un modèle adapté à la recherche cardio-vasculaire<sup>92</sup>. Pourtant, il est possible d'induire l'athérosclérose chez le rat, en utilisant des régimes extrêmement enrichis ou des lignées hyperlipiques sélectionnées dans les années 1990. Le rat devient alors un modèle biologique intéressant, même si les lésions d'athérosclérose obtenues sont réduites. Un des avantages de ce modèle, dans l'optique de notre étude, est que le placenta du rat est de type hémochorial, comme le placenta humain.

Inconvénients du modèle souris :

Défi technique (petite taille), donc suivi échographique anténatal difficile et peu d'échantillons biologiques disponibles (sang, tissus...)

La CETP (Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol) est absente

Les HDL sont prédominantes dans le plasma, conférant une certaine résistance à l'athérosclérose

Mise en route du génome embryonnaire et Métabolisme embryonnaire très différents de celui de l'homme (cf infra)

### 2.1.2. *Souris*

En tant que modèle expérimental, la souris est très avantageuse pour les raisons suivantes: c'est un mammifère de petite taille permettant un élevage facile, avec une gestation courte (19 jours), une puberté précoce (6-8 semaines), une longue durée de reproduction (jusqu'à 2 ans). La fécondation est facile à repérer (bouchon vaginal). La placentation est hémochoriale, comme chez l'Homme. Les portées de grande taille permettent l'obtention de grands groupes facilitant les analyses statistiques. De plus l'animal est docile, facile à manipuler. Enfin, il existe une synténie (ensemble de gènes dont l'organisation sur le chromosome est restée relativement conservée entre espèces au cours de l'évolution) chromosomique avec le génome humain. Le génome est entièrement séquencé, permettant une information génétique extensive et nombreuses lignées différentes de souris sont disponibles. La souris est ainsi devenue l'espèce la plus utilisée pour les études d'athérosclérose car certaines lignées présentent une grande variété de lésions athéromateuses induites (depuis la simple infiltration de cellules spumeuses jusqu'à des lésions matures). Cependant ces souris ne miment pas toujours parfaitement les conditions humaines et présentent certains inconvénients<sup>94, 95</sup>.

### Inconvénients du modèle porc :

La grande taille des porcs adultes et les difficultés de gestion qui en découlent sont des facteurs très limitant: hébergement, grande quantité d'agents pharmacologiques expérimentaux à administrer, difficultés de manipulation, coût. L'échographie est extrêmement difficile du fait de la paroi épaisse et de la taille de l'animal. L'intervalle intergénérationnel est très long (puberté vers 5 mois, gestation de 3 mois et demi, 2 portées par an).

L'autre inconvénient majeur est la placentation qui est epitheliochoriale.

Manque de connaissances sur le développement fœtal.

### 2.1.3. *Porc*

Le modèle porcin présente de nombreuses analogies avec l'homme et les avantages généraux suivants<sup>88, 90, 96</sup> : des organes comparables à ceux de l'homme en terme de taille, physiologie, histologie et développement. Certaines maladies métaboliques évoluent également de façon comparable. Le meilleur exemple est l'existence d'une athérosclérose spontanée. La taille de l'animal permet aussi l'imagerie des vaisseaux avec du matériel humain standard (évaluation coronaire directe) et des prélèvements itératifs d'échantillons biologiques. Il est également possible d'obtenir de grandes populations, mais à un coût très élevé. Il existe de plus une homologie de séquence et structure chromosomique avec l'homme, et le séquençage du génome est bien avancé (outils génétiques et protéomiques en progrès constant). En regard de la recherche sur l'athérosclérose, le porc présente les avantages spécifiques suivants<sup>88, 89, 96, 97</sup> : son métabolisme (profil lipoprotéique) est similaire à l'homme, il est omnivore, son système cardiovasculaire est très proche (anatomie coronaire similaire, données hémodynamiques). De plus, le porc développe spontanément des lésions d'athérosclérose avec l'âge et la topographie et morphologie des lésions d'athérosclérose sont très proches de l'homme.

La croissance rapide et la taille du porc domestique à maturité constituent des facteurs limitant son utilisation (90-118 kg à 6 mois et 363-454 kg à maturité). Le développement des porcs miniatures et des micro-porcs peut permettre de contourner certains de ces inconvénients. Ainsi, dans la lignée de mini-porcs Giuzhou, les adultes pèsent 14kg, et ils pèsent 40 à 80kg dans la lignée Yucatan<sup>92</sup>, contre près de 300kg pour un porc Large White adulte. Cependant le mode de placentation reste un élément limitant.



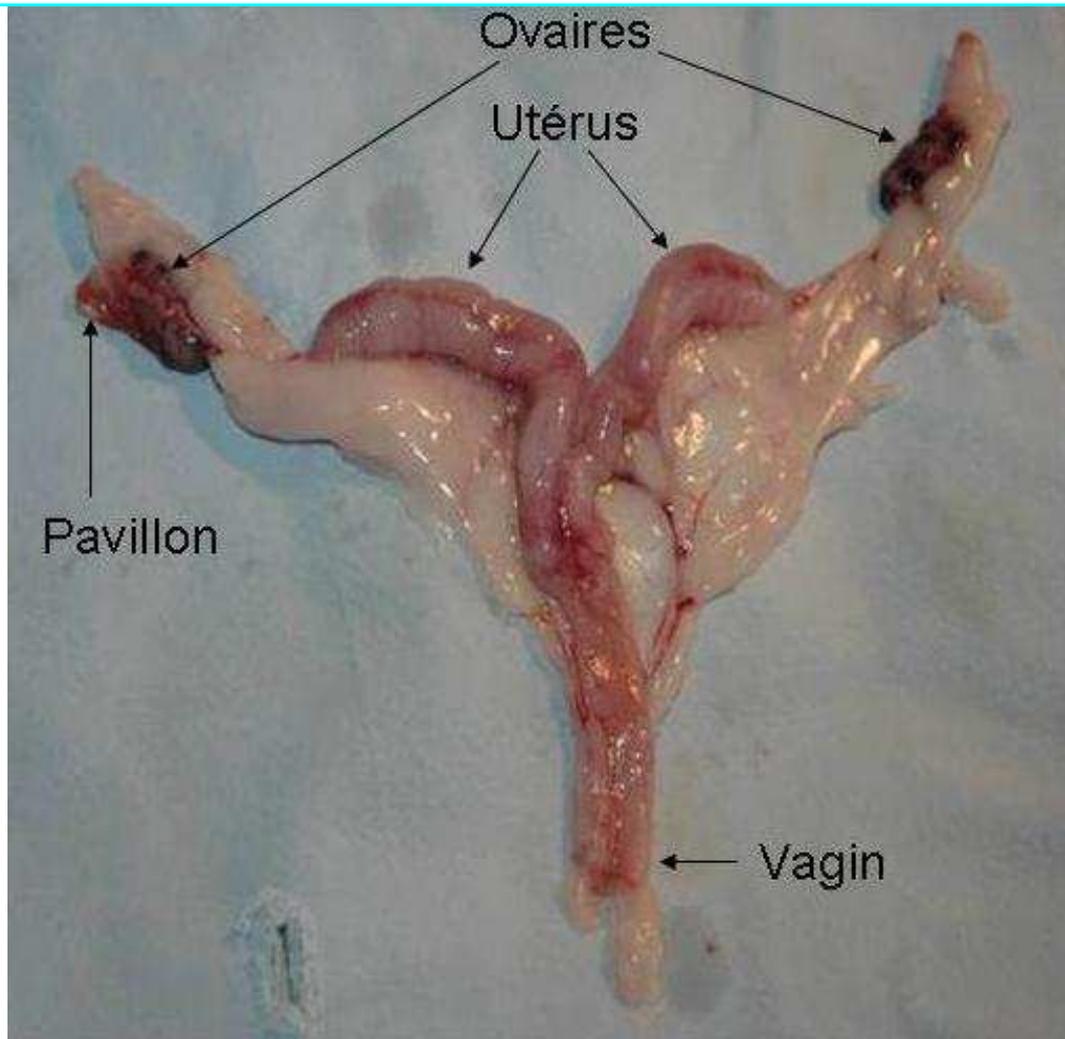
#### 2.1.4. *Lapin*

Le lapin remplit les conditions habituellement requises pour une utilisation en recherche : sa taille permet un élevage en cages de petites tailles, la durée de gestation est courte (30-31 jours) avec des portées pouvant aller jusqu'à une dizaine d'individus. Le suivi post-natal, en particulier la pesée et les prises de sang, ne pose pas de problème particulier en raison de la taille de l'animal. De plus, comme détaillé ci-dessous, ce modèle permet d'obtenir facilement un grand nombre d'ovocytes ou d'embryons. Le contrôle de l'ovulation étant facile, la programmation des expériences l'est d'autant. La culture des embryons de lapin est bien maîtrisée. Enfin, le lapin est un modèle dont l'intérêt est démontré pour l'étude des effets à long terme du régime hypercholestérolémique et pour la prévention de l'athérosclérose<sup>98</sup>.

#### *Métabolisme lipidique*

Le métabolisme lipidique du lapin est très proche de celui de l'Homme. Le lapin est très sensible à l'introduction de lipides et de cholestérol dans son alimentation, ce qui permet d'induire rapidement une hyperlipidémie et une hypercholestérolémie avec une concentration élevée de LDL dans le sang. Il a d'ailleurs été beaucoup utilisé comme modèle pour l'athérosclérose et les cardiomyopathies. En effet, le lapin présente les caractéristiques suivantes : athérosclérose spontanée et induite, lipoprotéines porteuses de l'ApoB et chylomicrons, LDL et VLDL similaires à celles de l'homme dans leur composition chimique<sup>88, 95</sup>. Le foie des lapins, comme celui de l'homme, produit des VLDL porteuses de l'ApoB100. La Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol (CETP) qui joue un rôle central dans l'athérosclérose, est abondante dans les plasmas de l'homme et du lapin.

Concernant l'étude de la gestation, il a déjà été décrit qu'un régime enrichi en cholestérol



**Photo 1. Tractus génital d'une lapine.**

L'utérus est bicorne bicervical permet facilement d'introduire des embryons dans les trompes par les pavillons sans risque d'interversion.

(0,2%) débuté 7 jours avant la mise à la reproduction et poursuivi jusqu'à la mise bas induit une diminution de 15% du poids des lapereaux<sup>81</sup>. Ce retard de croissance est associé à une diminution de la synthèse de cholestérol par le foie de la lapine gestante et par le foie foetal. Cette diminution est compensée par une augmentation de la synthèse placentaire<sup>83</sup>. Le fait que le modèle lapin ait déjà été utilisé et publié par Montoudis et son équipe dans des conditions expérimentales proches de ce que nous voulions faire, avec des conséquences importantes sur le fœtus et le nouveau-né, est fondamental dans le choix de notre modèle.

#### *Anatomie des organes génitaux internes*

L'utérus est bicorné et bicervical donnant des possibilités de transfert embryonnaire in utero par voie chirurgicale<sup>99</sup> ou non<sup>100</sup>, permettant le développement in vivo de plusieurs conceptus issus de 2 conditions expérimentales différentes (traité et contrôle par exemple), sans risque d'interversion (Photo 1).

#### *Folliculogénèse chez la lapine*

La croissance folliculaire chez la lapine est un processus continu qui présente des vagues de croissance suffisamment rapprochées pour garantir une présence quasi permanente de follicules pré-ovulatoires matures. En l'absence de stimuli (coït ou stimulation hormonale), les follicules pré-ovulatoires se maintiennent de 3 à 10 jours, entraînant l'atrésie de tout follicule en croissance atteignant un diamètre de 700 µm. L'atrésie des follicules matures permet le renouvellement folliculaire en l'espace de 35 à 50 heures<sup>101</sup>. Par conséquent, la lapine possède, en théorie, la capacité d'ovuler à tout moment de son cycle de reproduction<sup>102</sup>. En saillie naturelle, l'ovulation est normalement induite par l'accouplement qui entraîne le pic de LH. L'ovulation suit d'une douzaine d'heures ce pic de LH<sup>102</sup>.

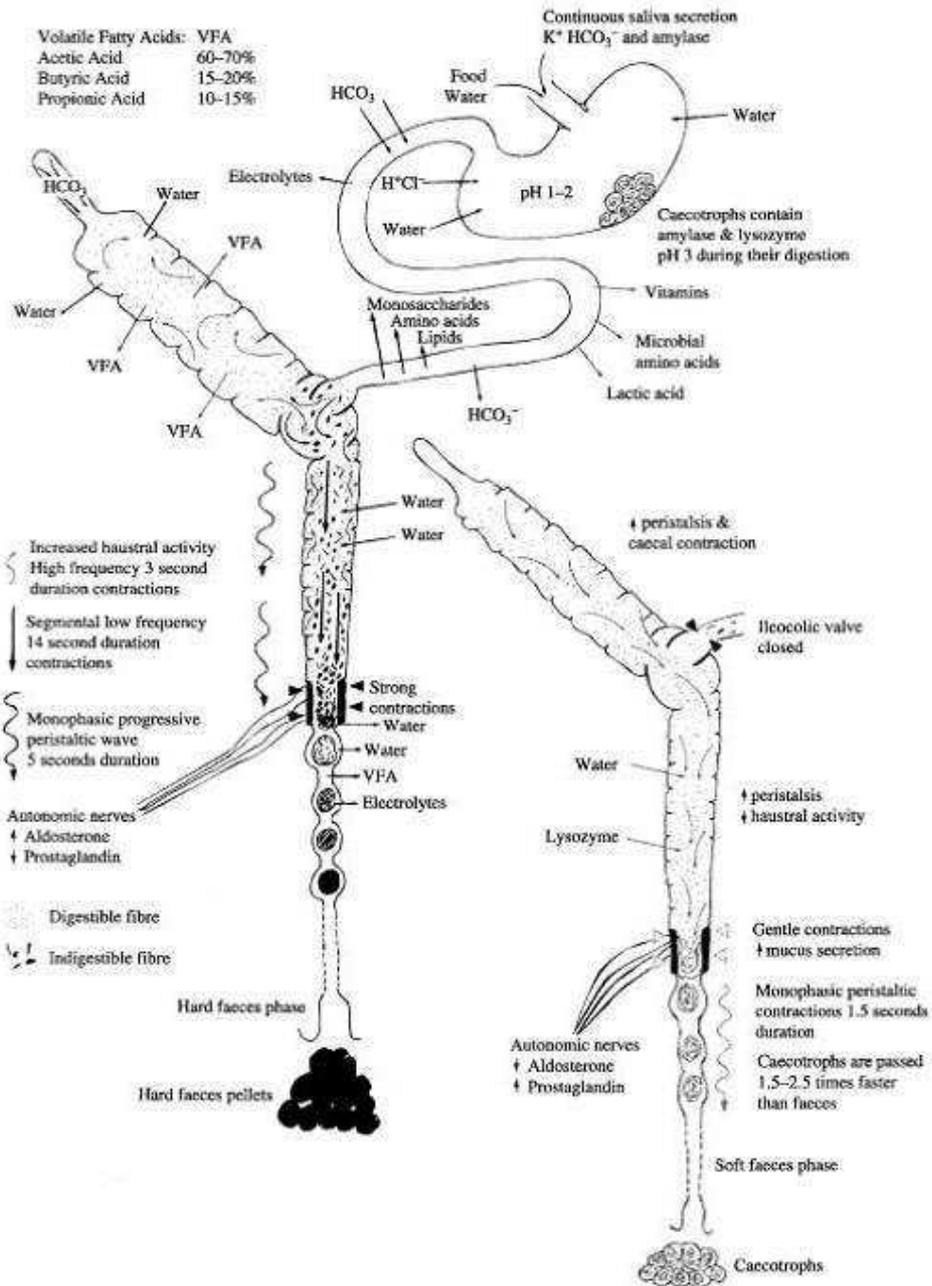
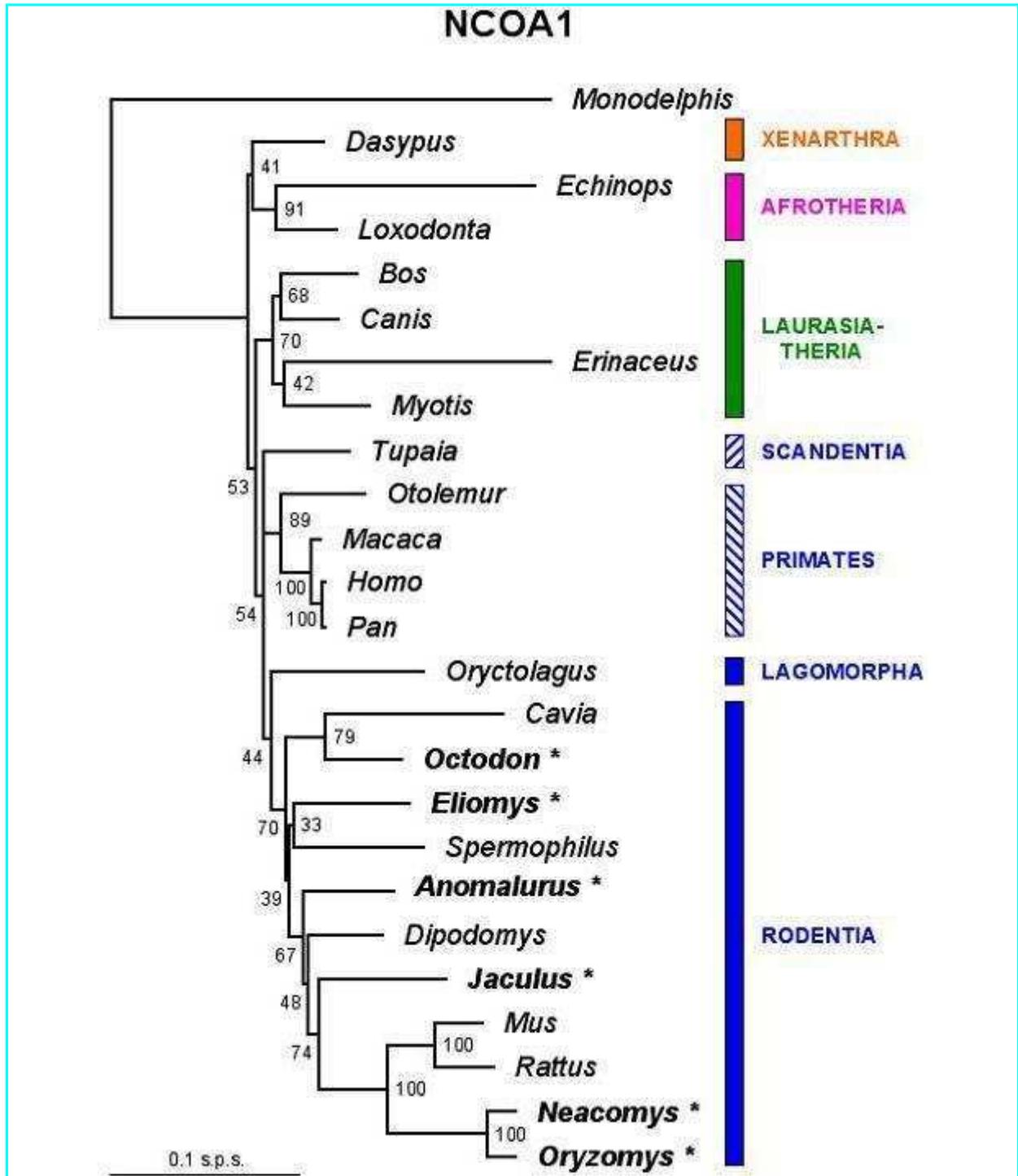


Figure 13. Illustration des différentes étapes de la digestion chez le lapin.  
 D'après <sup>103</sup>.

### *Physiologie de la digestion, Caecotrophie*

La physiologie digestive du lapin a été détaillée dans une revue de la littérature effectuée par Rees Davies et al.<sup>103</sup> et représente une limite du modèle.

Dans les conditions naturelles, le lapin est un folivore : il ne mange que les feuilles des plantes. Cette alimentation est donc naturellement pauvre en calories et riche en fibres non digestibles. Le schéma ci-contre illustre les différentes étapes de la digestion du lapin (Figure 13)<sup>103</sup>. La physiologie digestive du lapin est marquée par la caecotrophie. Il existe dans le colon une séparation entre les déchets non digestibles et les déchets pouvant subir un nouveau processus de digestion, les caecotrophes. Lors du passage dans la partie distale du colon, ces particules sont recouvertes de mucus, et émises par l'anus où elles sont directement récupérées pour être ingérées. Elles ne sont pas mâchées et le mucus assure une certaine protection de l'acidité gastrique. Cependant, à l'intérieur du caecotrophe, la fermentation bactérienne continue avec formation d'acide lactique. La production de lactates par les caecotrophes va en quelque sorte tamponner le milieu gastrique et le rendre moins acide. Le bol gastrique contenant les caecotrophes passe alors dans l'intestin où l'action des enzymes secrétées par le pancréas et le foie va entraîner la digestion et l'absorption des électrolytes, acides aminés, acides gras volatils, vitamines, de protéines d'origine microbienne mais surtout d'enzymes d'origine microbienne comme de l'amylase qui vont améliorer le processus digestif. Ce mécanisme de double digestion ne peut être réalisé que si l'aliment de base est riche en fibres. Ce phénomène est important à connaître car toute modification de l'aliment de base peut s'accompagner d'une perturbation de ce cycle et avoir des conséquences graves sur la santé du lapin<sup>103</sup>. Ainsi il n'est pas exclu que le fait de donner un régime enrichi à un lapin ait des conséquences plus importantes que supposé : une partie des aliments non digérés lors du premier passage digestif peut l'être lors du second passage.



**Figure 14. Distance phylogénétique entre espèces.**

Analyse du gène NCOA1, d'après <sup>104</sup>. Les lagomorphes (dont fait partie le lapin) (en rouge) sont plus proches des primates (en bleu) que ne le sont les rongeurs (en vert).

Le lapin est un animal phylogénétiquement plus proche de l'Homme que les rongeurs

### *Phylogénie*

La distance phylogénétique qui sépare les primates des rongeurs est supérieure à celle séparant les primates du lapin<sup>104, 105</sup>. Ranwez et al. ont réalisé une analyse moléculaire des séquences nucléotidiques de plusieurs espèces grâce à la base de données Ensembl<sup>104</sup>. Plus de 3000 exons d'une taille supérieure à 400 paires de bases ont été inclus dans l'analyse. Un exemple des arbres phylogénétiques obtenus pour l'exon 11 du gène NCOA1 (Human Nuclear Receptor CO-Activator 1) est montré ci-contre et illustre bien que la distance entre lagomorphes et primates est inférieure à la distance entre rongeurs et primates (Figure 14). De plus, le génome des muridés (rat, souris, hamsters) évolue plus vite que celui des mammifères de plus grande taille.

Le génome lapin est donc plus proche du génome humain que celui de n'importe quel rongeur ou autre animal domestique. Si l'objectif est d'évaluer les conséquences d'une perturbation environnementale sur l'expression de gènes humains à partir d'un modèle animal, il est important d'utiliser le modèle dont le génome est le plus proche possible de l'humain.



### 2.1.5. *Activation du génome embryonnaire*

Chez les mammifères, l'embryon se forme à partir de deux lots de chromatine très différents : celle hyper compactée par les protamines du spermatozoïde et celle sous forme de chromosomes arrêtés au stade métaphase II de l'ovocyte. Après la fécondation, l'ovocyte activé doit absolument remodeler ces deux génomes transcriptionnellement inactifs provenant des gamètes mâle et femelle en un génome diploïde totipotent et fonctionnel. Le développement dépend donc strictement de l'héritage maternel en ARN et en protéines présents dans l'ovocyte et surtout accumulés au cours de la période de croissance folliculaire et peu pendant la période de maturation, avant l'ovulation. La durée de vie de ces transcrits est très variable. Leur remplacement après la fécondation implique une transition avec la mise en activité des gènes exprimés directement à partir du génome de l'embryon. L'ensemble des étapes qui constitue le passage d'un contrôle maternel à un contrôle embryonnaire du développement est initié à un moment variable de la période pré-implantatoire, selon les espèces. On se réfère à ce phénomène en utilisant le terme « Maternal to Embryonic Transition » ou « Transition Materno Embryonnaire » (TME) <sup>106</sup>. Le stade embryonnaire analysé en biologie moléculaire au cours de cette thèse est le stade de la mise en route du génome ou Transition Materno Embryonnaire.

L'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire se fait en deux phases : une phase dite mineure correspondant à une activité transcriptionnelle réduite et une phase dite majeure durant laquelle il y a une augmentation rapide de la synthèse de transcrits. Si la phase mineure débute au même stade de développement chez tous les mammifères (stade 1 cellule), le début de la phase majeure diffère selon les espèces (2 cellules chez la souris<sup>106</sup>, 4-8 cellules chez l'Homme<sup>107</sup>, 8-16 cellules chez le lapin<sup>108</sup>).

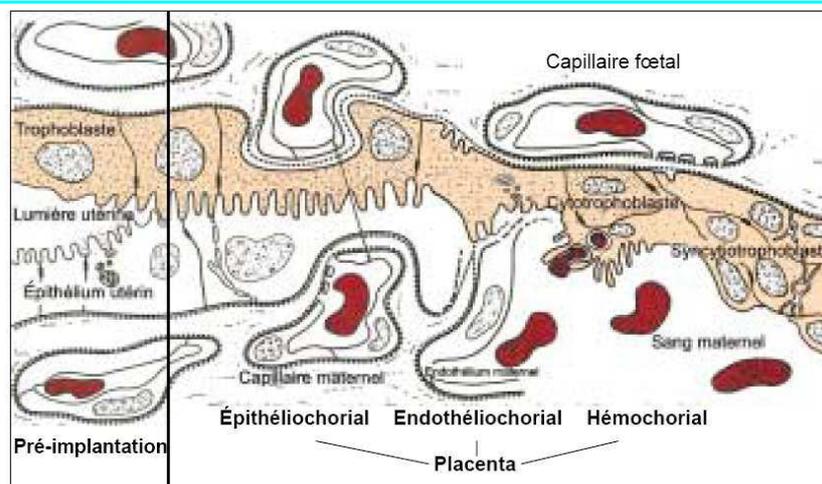
La transition materno-embryonnaire consiste en un processus progressif et séquentiel permettant le transfert du contrôle du développement maternel au contrôle zygotique, et comprend :

la dégradation de transcrits et protéines spécifiques de l'ovocyte dont le maintien serait délétère à la suite du développement <sup>109</sup>.

le remplacement des transcrits maternels par des transcrits embryonnaires <sup>110</sup>.

A partir de là, certains des ARN et protéines nouvellement synthétisés sont indispensables à la poursuite immédiate du développement de l'embryon. Cette TME est dépendante de la disponibilité et de l'activité des composants de la machinerie transcriptionnelle de base mais aussi de l'évolution de la structure des noyaux après la fécondation. En effet, au cours des cycles cellulaires, les génomes maternel et paternel subissent une réorganisation intense de la structure chromatinienne, réorganisation qui constitue un élément clé dans la régulation de la transcription embryonnaire. Cette régulation implique des mécanismes de déméthylation et d'acétylation de l'ADN<sup>111</sup>.

Dans toutes les espèces, l'activation du génome et les modifications épigénétiques ont lieu avant les premières étapes de différenciation cellulaire au stade blastocyste. La souris est le modèle animal le plus utilisé pour étudier la mise en route du génome. Cependant, dans ce modèle, la transcription débute de façon brutale, en association avec des altérations épigénétiques elles aussi brutales. Chez de nombreuses espèces de mammifères, la phase majeure d'activation du génome apparaît retardée par rapport à celle observée chez la souris, y compris chez le lapin<sup>112</sup>. Pour évaluer le mécanisme de ces modifications épigénétiques, Bellier et al. ont analysé la translocation nucléaire et la phosphorylation de la partie carboxy-terminale de la ARN-polymérase II chez la souris et le lapin. Ces événements se produisent au stade 2 cellules chez la souris et 8-16 cellules chez le lapin et semblent des déterminants majeurs de la transition materno-embryonnaire<sup>113</sup>. Chez le lapin, une activité transcriptionnelle est détectée dès le stade 1 cellule, mais le niveau d'expression génique reste faible jusqu'aux stades 8-16 cellules. Ce n'est qu'à partir de ce stade que la transcription embryonnaire devient indispensable au développement<sup>114</sup>.



**Figure 15. Schéma des différents types de placentation.**

La placentation épithéliochoriale (ruminants) se caractérise par la simple apposition de l'épithélium trophoblastique du chorion fœtal à l'épithélium utérin. L'invagination des capillaires dans les épithéliums trophoblastiques et maternel réduit la distance entre les circulations fœtales et maternelles. Lors de la placentation endothéliochoriales (carnivores), l'invasion du trophoblaste entraîne une destruction de l'épithélium utérin. Le trophoblaste se différencie souvent en cytotrophoblaste et en syncytiotrophoblaste. Enfin, la destruction par le trophoblaste de l'épithélium utérin et des vaisseaux maternels entraîne la formation du placenta hémochorial (rongeurs, primates), où le trophoblaste est directement baigné par le sang maternel. Suivant les espèces, le trophoblaste se présente sous la forme d'une structure à trois couches différenciées en cyto et/ou syncytiotrophoblaste. D'après <sup>115</sup>.

### 2.1.6. *Métabolisme embryonnaire*

Les connaissances du métabolisme embryonnaire sont parcellaires. Les besoins métaboliques de l'embryon de lapin sont différents de ceux des embryons de rongeurs et semblent plus proches de ceux de l'embryon humain, ce qui justifie que l'embryon de lapin soit préférentiellement utilisé pour nos travaux.

Aux stades précoces, la voie d'utilisation du glucose dans le cycle de Krebs chez les rongeurs est bloquée au niveau de la glucose-6 phosphate isomérase, ce qui fait que le milieu de culture doit contenir du pyruvate qui est directement utilisable. Par la suite, à partir du stade 8 cellules, le glucose devient la principale source d'énergie de l'embryon de souris<sup>116</sup>. Ce n'est pas le cas chez l'humain<sup>117</sup> ni chez le lapin<sup>118</sup> chez qui le glucose peut être directement utilisé dès le début du développement, même si le pyruvate reste nécessaire<sup>119, 120</sup>. En ce qui concerne les acides aminés, les besoins de l'embryon humain, comme celui de lapin, sont plus importants que pour l'embryon de souris<sup>117, 121 122</sup>. Enfin, le métabolisme lipidique de l'embryon pré-implantatoire n'a, à notre connaissance, pas été étudié.

### 2.1.7. *Placentation*

La placentation du lapin est similaire, mais non identique à celle de l'Homme. Les deux types de placentas sont discoïdes et hémochoriaux. « Hémochorial » signifie qu'il y a une invasion de l'endomètre par le chorion et que les villosités choriales baignent dans le lac sanguin maternel. Les différents types de placentation sont présentés en Figure 15. L'invasion de l'endomètre par le chorion chez le lapin se fait par un mécanisme de fusion, celui de l'homme par un mécanisme d'intrusion. Les principales différences sont donc que le placenta du lapin est hémochorial et labyrinthique alors que celui de l'Homme est

Définitions :

Invasion par substitution (ou déplacement) (rat, souris) : une fois au contact de la membrane basale, le trophoblaste émet des prolongements cytoplasmiques qui facilitent le décollement des cellules épithéliales qui rentrent en apoptose avant d'être phagocytées. Le placenta est hémotrichorial.

Invasion par fusion (lapin) : le syncytiotrophoblaste fusionne avec les cellules utérines formant un syncytium transitoire qui pénètre la membrane basale. Ce processus s'apparente à la migration des cellules trophoblastiques binucléées qui aboutit à la formation d'un syncytium intercalé parmi les cellules épithéliales utérines caractérisant le placenta synépiteliochorial des ruminants.

Invasion par intrusion (carnivores, rhésus, homme) : le syncytiotrophoblaste s'insère entre les cellules épithéliales utérines avant de les phagocyter. Au cours du processus le trophoblaste établit des jonctions cellulaires (desmosomes) avec les membranes plasmiques des cellules utérines.

Absence d'invasion : l'endomètre et le chorion sont séparés par une couche épithéliale. Le placenta est épitheliochorial (porc).

hémomonochorial et villosité<sup>123</sup>. Le placenta du porc est lui épitheliochorial, celui des rongeurs hémotrichorial, avec une invasion réalisée par substitution ou déplacement. Parmi les modèles expérimentaux, le lapin a donc le placenta anatomiquement le plus proche de l'homme, exclusion faite des primates et du cochon d'inde. De plus, le développement du placenta au cours de la gestation subit des modifications hémodynamiques comparables à celles du placenta humain<sup>124</sup>. Les courbes de croissance fœtales et placentaires du lapin NZW sont comparables aux courbes humaines pour lesquelles la croissance placentaire est plus rapide pendant la première moitié de la grossesse que pendant la seconde où c'est le fœtus qui a une croissance plus rapide<sup>125</sup>. Les modifications structurales placentaires au cours de la seconde partie de la gestation sont également similaires à celles décrites chez l'Homme : la capacité d'échanges augmente avec le terme sans augmentation importante de la taille du placenta<sup>125</sup>. De plus, McArdle et al. ont démontré une relation entre la structure du placenta et l'expression de gènes tels que ceux contrôlant le système rénine – angiotensinose –aldostérone, faisant du modèle un lapin un candidat idéal pour l'étude des pathologies placentaires et de la pré-éclampsie en particulier<sup>125</sup>.

#### 2.1.8. *Morphogénèse embryonnaire*

Une revue de la littérature publiée en 2003 par des chirurgiens pédiatres montre que la morphogénèse post implantatoire de l'embryon de lapin est proche de celle de l'homme selon les critères de Carnegie<sup>126</sup>. Ainsi, le lapin est un modèle de choix pour l'analyse et la compréhension de la survenue des malformations fœtales.



### 2.1.9. *Suivi échographique anténatal*

Un des objectifs de ce travail de thèse est non seulement d'évaluer les conséquences à long terme des perturbations environnementales, mais aussi d'évaluer les perturbations précoces. La méthode non invasive qui permet un suivi longitudinal de la croissance fœtale est l'échographie. La sonde d'échographie se comporte comme un émetteur et un récepteur d'ultrasons. Il « émet » durant un laps de temps et « écoute » ensuite les sons réfléchis. Un appareillage électronique complexe transforme l'information recueillie (différence entre les ultrasons émis et reçus) en une image interprétable par l'opérateur. Ainsi ce qui ne renvoie pas d'ultrason apparaît en noir et correspond aux liquides, et ce qui renvoie le plus d'ultrason (tissus solides, os) apparaît en blanc. Entre les deux s'échelonnent tous les niveaux de gris en fonction de la capacité des tissus à renvoyer les ultrasons vers la sonde.

La taille du lapin, sa manipulation aisée et la taille des fœtus permettent un suivi échographique comme cela a été démontré précédemment dans notre équipe<sup>127</sup>. La réalisation pratique de ces échographies est détaillée dans la section Matériels et Méthode (Chapitre D). De plus, une équipe italienne a montré que l'analyse des flux Doppler utérins, ombilicaux, aortiques et de la veine cave était réalisable chez le lapin<sup>128</sup>. L'analyse hémodynamique par la mesure des Doppler chez la femme enceinte et son fœtus est un élément de prise en charge courant des grossesses compliquées de retard de croissance intra-utérins et de prééclampsie.

Au moment du début des travaux présentés dans cette thèse, l'échographie des rongeurs n'était pas développée. Depuis, ont été développés des appareils avec des sondes spécifiques aux petits animaux, à haute fréquence et de faible poids. Avant ces progrès techniques, l'échographie animale se réalisait avec des appareils destinés à l'imagerie humaine ou vétérinaire. De plus, la réalisation de l'échographie chez les rongeurs est beaucoup plus difficile de par la petite taille de l'animal et du fœtus. La précision des mesures nécessite



d'avoir des sondes avec une résolution spatiale très fine, et des fréquences d'émission des ultrasons très élevées. En effet, plus la cible mesurée est grande, plus la qualité de l'image et la précision des mesures est bonne et plus la fréquence est haute, mieux on peut observer une cible proche de la sonde. La possibilité de réaliser des échographies chez le lapin renforce l'intérêt de ce modèle dans l'exploration des pathologies gestationnelles.

#### 2.1.10. *Outils disponibles et expertise du laboratoire*

Le modèle lapin est bien connu de notre laboratoire, tant pour ce qui est des contraintes d'élevage que pour l'utilisation en recherche sur la reproduction. La culture d'embryons, le transfert d'embryons sont des techniques maîtrisées et utilisées de façon courante.

Un réseau d'ADNc dédié à l'embryon pré-implantatoire a été établi dans l'unité. Cet outil permet d'analyser les modifications d'expression de gènes à différents stades du développement pré-implantatoire. Cet outil a déjà été utilisé pour l'analyse de la dynamique d'expression des gènes dans l'embryon développé *in vivo* et de ses modifications par la culture *in vitro* (Thèse Roger Léandri, Université Paris XI, 2009)<sup>129</sup>. Ce réseau permet d'analyser 2022 contigs. Un réseau plus étendu est en cours de mise au point. La puce commercialisée par Agilent qui permet désormais de couvrir environ 67% du génome (13798 gènes) (<http://www.sigenae.org/index.php?id=166>) n'était pas développée au début de cette thèse.

#### *Paramètres biochimiques des lapines en dehors de la gestation*

L'article de référence concernant les paramètres biochimiques des lapins de la souche NZW est celui de Mizoguchi et al<sup>80</sup>. Les données disponibles avant cette étude étaient anciennes et peu nombreuses<sup>79, 130</sup>. Mizoguchi et al. ont étudié de nombreux paramètres. Parmi ceux qui nous intéressent le plus dans le cadre de cette thèse, notons que le taux de cholestérol de base est de 0,54+/-0,12 g/L. Le taux de triglycérides est de 0,45+/-0,13ng/L. La glycémie de base est de 7,07+/-0,59mmol/L<sup>80</sup>.



### 2.1.11. *Le lapin Watanabe*

En 1975, Kondo et Watanabe ont découvert un lapin mâle mutant avec un taux de cholestérol remarquablement élevé<sup>131</sup>. Ils ont isolé la mutation et développé la lignée «Watanabe Heritable HyperLipidemic» (WHHL) dont les sujets présentent une hyperlipidémie congénitale<sup>132</sup>. Ces lapins présentent une anomalie du récepteur aux LDL responsable d'altérations pathologiques du métabolisme du cholestérol, et par voie de conséquence, d'athérosclérose<sup>92, 133</sup>. Ils constituent un modèle animal pour la maladie congénitale humaine de l'hypercholestérolémie familiale, qui est reconnue depuis longtemps comme un important facteur de risque d'athérosclérose<sup>88</sup>.

Ces lapins développent une hypercholestérolémie et une hypertriglycémie, avec des taux environ 8 à 14 fois supérieurs aux contrôles, quel que soit l'âge<sup>132</sup>. A l'autopsie, à l'âge de 5 mois, les lapins WHHL présentent des lésions spontanées d'athérosclérose aortique dans 100% des cas et des lésions interdigitées de xanthome chez 60% des individus après 16 mois<sup>132</sup>. Ces lésions consistent en un épaissement intimal, des cellules spumeuses et une composante fibreuse, comparables aux lésions observées chez l'homme<sup>88</sup> ainsi que chez le lapin NZW sous régime hypercholestérolémiant. L'utilisation des WHHL a notamment permis la caractérisation du rôle des LDL dans l'athérosclérose<sup>134</sup> et le développement de molécules hypocholestérolémiantes (inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase et statines).

Mortensen et al. ont comparé le profil lipidique et la prolificité de lapines Watanabe homozygotes, hétérozygotes et New Zealand White (NZW) pendant la gestation après mise à la reproduction avec des mâles Watanabe homozygotes<sup>135</sup>. Les lapines WHHL hétérozygotes avaient les mêmes taux de lipides plasmatiques que les lapines NZW et ont développé de minimes lésions d'athérosclérose à partir de l'âge de 2 ans. Malheureusement ces auteurs

	Rat		Souris		Porc		Lapin	
	Avantages	Inconvénients	Avantages	Inconvénients	Avantages	Inconvénients	Avantages	Inconvénients
Phylogénie	Proche		Proche			Eloigné	Très proche	
Manipulation	Aisée		Aisée			Difficile	Aisée	
Elevage	Facile		Facile		Difficile, couteux		Facile	
Alimentation	Omnivore		Omnivore		Omnivore			Herbivore
Métabolisme lipidique		Eloigné de l'homme, résistance à l'athérosclérose		Eloigné de l'homme, résistance à l'athérosclérose	Proche		Proche	
Métabolisme embryonnaire		Eloigné		Eloigné			Proche	
Durée de Gestation	22j		20j			115j	31j	
Implantation		J5		J5		J14	J6,5 (Homme J6)	
Placentation	Hémochoriale		Hémochoriale			Epitheliochoriale	Hémochoriale	
Mise en route du génome embryonnaire		Brutale		Brutale, Phase majeure : 2 cellules		Phase Majeure : 4 cellules	Comparable, progressive Phase majeure : 8-16 cellules	
Suivi échographique anténatal	oui	Echographe spécifique	oui	Echographe spécifique	Oui	Très difficile, voire dangereux	oui	
Prolificité	oui		oui		oui		oui	

**Tableau 2. Récapitulatif des principaux avantages et inconvénients des modèles animaux utilisables.**

n'ont pas décrit les poids des lapereaux ni leur devenir à long terme. La prolificité des lapines WHHL homozygotes était de 14% inférieure à celle des lapines NZW. Shiomi et al. avaient déjà observé que la taille de la portée et le nombre de lapereaux atteignant la période de sevrage chez les lapines WHHL homozygotes était significativement diminués chez les lapines NZW et les lapines WHHL hétérozygotes<sup>136</sup>.

A notre connaissance, ce modèle de lapin n'a jamais été utilisé pour l'étude de la programmation fœtale. Il serait donc intéressant pour notre laboratoire d'étudier ce modèle. Nous n'avons pas fait nos expériences sur ce modèle car il n'était pas disponible dans notre lapinerie.

#### 2.1.12. *Conclusion*

Du fait de la placentation hémochoriale, du métabolisme lipidique et embryonnaire proche de l'humain, du réseau d'ADNc dédié disponible, de la taille de l'animal qui permet de réaliser une surveillance échographique de la gestation, de la similitude de la morphogénèse embryonnaire post-implantatoire avec l'homme<sup>126</sup> et des données existantes à partir d'un modèle similaire<sup>81, 98</sup> ( Tableau 2 ), le lapin nous paraît être le meilleur modèle pour évaluer l'influence de l'alimentation hyperlipidique hypercholestérolémique sur l'expression génique embryonnaire, le développement fœtal et le développement de maladies à long terme.



### 3. Régime

Pour les raisons expérimentales qui viennent d'être décrites, notre choix s'est porté sur le lapin. Le régime normal du lapin contient peu de lipides. A notre connaissance, la première étude de l'effet d'un régime hypercholestérolémique pendant la gestation a été publiée en 1997 par l'équipe de Herrera<sup>137</sup>. L'expérience a été faite chez le rat en utilisant un régime enrichi de 2% de cholestérol et 1% d'acide cholique. Ce régime a induit des modifications biochimiques maternelles sans retentissement fœtal. Par la suite, Montoudis et al.<sup>81, 83, 138</sup> et Napoli et al.<sup>98</sup> ont utilisé le modèle lapin déjà utilisé comme modèle adulte d'athérosclérose (New Zealand White) pour évaluer l'effet d'un régime hypercholestérolémique sur le développement fœtal. Ils ont ainsi créé le premier modèle d'athérogénèse fœtale, induite par l'alimentation maternelle<sup>98</sup>. Dans cette dernière étude, les quantités de lipides (8%) et de cholestérol (0,1 à 0,2%) dans l'alimentation ont été ajustées afin d'obtenir les concentrations plasmatiques désirées par les auteurs, correspondant à des concentrations plasmatiques de cholestérol de femmes enceintes d'une de leurs études précédentes<sup>139</sup> c'est-à-dire 150 à 350mg/dL alors que les taux de base (avant régime) était de 58mg/dL. Dans cette étude faite sur des lapins New Zealand White nourris avec un régime débuté 2 semaines avant la mise à la reproduction et poursuivi 2 semaines après la mise bas, Napoli et al. ont non seulement démontré qu'un régime enrichi en lipides et cholestérol entraînait des lésions d'athérosclérose fœtale, mais ils ont montré que l'administration simultanée d'antioxydants (cholestyramine, vitamine E) permettait de les réduire<sup>98</sup>. Mountoudis et al. ont réalisé une étude chez des lapins New Zealand White en utilisant un régime enrichi avec 0,2% de cholestérol, débuté une semaine



avant la mise à la reproduction. Ce régime induit bien une hypercholestérolémie chez les lapines gestantes et induit une diminution du poids de naissance des lapereaux d'environ 15%<sup>81</sup>. Dans cette étude il n'y a pas eu de suivi post-natal des lapereaux.

L'objectif pour nous était d'utiliser un régime Hyperlipidique et Hypercholestérolémique (HH) qui devait induire une hyperlipidémie et une hypercholestérolémie sans induire d'avortement. Etant donné qu'il était très difficile d'adapter le régime au quotidien en fonction de résultats de dosages sériques chez les lapins, nous avons choisi d'utiliser un aliment enrichi à 0,2% de cholestérol et 8% de lipides (régime HH) par rapport au régime témoin (C), proche de celui décrit par Napoli et al.<sup>98</sup>, mais contenant plus de fibres qui sont indispensables au lapin (14% contre 4% chez Napoli et al.). Il faut également noter que Napoli et al. ne détaillaient pas le reste de la composition alimentaire, dite « standard ». Des résultats préliminaires dans notre laboratoire avec utilisation de cet aliment HH ont confirmé qu'il était compatible avec une viabilité néonatale conformément aux résultats de Montoudis et al.<sup>81</sup> et contrairement à ce qui avait été montré dans des publications anciennes<sup>140</sup>.

L'aliment correspondant à nos besoins, riche en lipides, cholestérol et en fibres n'existait pas dans le commerce. Tous les aliments ont donc été préparés dans l'unité expérimentale de Castanet-Tolosan. Les proportions de lipides (8%) et de cholestérol (0,2%) utilisées dans notre étude correspondent à ce qui est utilisé dans la littérature et sont très élevées pour le lapin qui est normalement folivore alors que la quantité de lipides dans l'alimentation humaine peut dépasser 30%. De plus, au-delà de 8% de lipides, il n'était pas possible de produire un aliment au sein de l'INRA de Toulouse pour des raisons technologiques. Il aurait été possible d'aller jusqu'à 16% de lipides en ajoutant des lipides et du cholestérol à des croquettes achetées dans le commerce. Dans ce cas, nous n'aurions pas maîtrisé la composition globale des croquettes, en particulier pour la composition en protéines. Nous avons donc décliné cette solution.



En effet, avec un tel taux de lipides, les croquettes ne gardent pas leur forme. L'aliment fabriqué contient également une forte proportion de fibres (14%) afin de couvrir les besoins de l'animal, qui est identique dans l'aliment enrichi et l'aliment contrôle.

L'huile de soja (Sigma) et le cholestérol (Sigma) ont été utilisés comme source de lipide et de cholestérol pour enrichir l'aliment de base. L'huile de soja était le supplément utilisé par Palinski et al.<sup>141</sup>. Le reste de la composition de l'aliment était strictement identique entre l'aliment HH et l'aliment Contrôle C. L'aliment HH pourvoit ainsi une quantité d'énergie de 16% supérieure à l'aliment C. L'aliment est également riche en fibres, indispensables au lapin (voir chapitre 2.1.4 sur la physiologie digestive du lapin). Les deux aliments étaient disponibles sous forme de granulés et distribués ad libitum. Les aliments étaient régulièrement pesés afin de pouvoir déterminer les quantités ingérées, et ainsi calculer les quantités d'énergie et de lipides ingérés.

## **4. Prélèvements sanguins**

### **4.1. *Technique de prélèvement***

Les prélèvements sanguins ont été réalisés après une nuit de jeûne au niveau de la veine périphérique de l'oreille. Après repérage du vaisseau, une légère dépilation est effectuée en regard du point de ponction. La dilatation de la veine est obtenue par réchauffement manuel de l'oreille et utilisation de « wintergreen oil » (huile essentielle de Gaulthérie, aux vertus antalgiques, anti-inflammatoires et vasodilatatrices). Un cathéter de 22G est alors placé dans le vaisseau (Photo 2). Tous les échantillons ont été recueillis sur des tubes EDTA de 5ml. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 3000 tours/min, pendant 15 min dans l'heure suivant le prélèvement, puis les échantillons ont été repartis en plusieurs aliquots et stockés à -20°C jusqu'à analyse.



**Photo 2. Pose du cathéter sur une oreille de lapin.**

Ce cathéter peut être utilisé pour prélèvement sanguin ou prise de tension artérielle au niveau de l'artère centrale de l'oreille.

Dans notre étude, les prélèvements sanguins n'ont pas été réalisés avant le sevrage en raison de la petite taille des oreilles et de la veine périphérique de l'oreille à cet âge. Pour les lapins prélevés plusieurs fois au cours de l'expérience, nous changions de côté à chaque fois. En utilisant cette technique, les échecs de prélèvements étaient exceptionnels. Il a été constaté de façon épisodique des hématomes, sans conséquence pour l'animal. Dans les quelques cas d'échec sur la veine périphérique, l'autre oreille a été ponctionnée.

#### **4.2. Méthodes de dosages des métabolites**

Les taux plasmatiques de cholestérol total, HDL et de triglycérides ont été mesurés par technique immuno enzymatique (Roche Diagnostics, Basel, Suisse) déjà validée chez le lapin<sup>142</sup>. Le dosage du glucose et de l'insuline ont été faits en utilisant un Autoanalyser (Chemical Profile Analyser CPA, Coultronics, Margency, France) avec des kits commerciaux (Glucose quant, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) à partir de plasma.



**Photo 3. Préparation de la lapine pour faire l'échographie.**

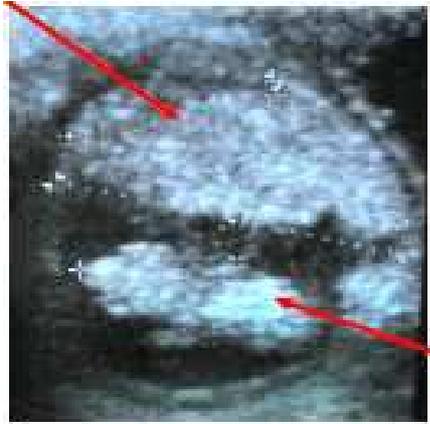
La lapine est allongée sur le dos, abdomen rasé, placée dans la boîte de contention.

## **5. Surveillance fœtale : l'échographie**

La croissance fœtale et placentaire a été analysée par échographie trans-abdominale à J9, J14, J21 et J28<sup>127</sup>. Les lapines étaient placées en décubitus dorsal dans une cage dédiée afin de limiter les mouvements, sans anesthésie (Photo 3).

Les échographies ont été réalisées à l'aide d'un échographe Philips HDI 5000 (Philips, Best, The Netherlands) équipé d'une sonde de 5 à 7,5Mhz. La vessie était localisée, et les deux fœtus les plus proches de la vessie, dans chaque corne utérine, ont été mesurés, ce qui fait 4 fœtus par lapine. Les mesures incluaient : la taille du sac gestationnel (J14 et J21), la longueur et l'épaisseur du placenta (J9 et J14), la longueur et le diamètre abdominal transverse du fœtus (J9 et J14), le périmètre abdominal, la longueur de la tête, le diamètre bipariétal, la fréquence cardiaque (J14 et J21), la longueur et la largeur des reins (J28). Des exemples de photos d'échographie sont présentés (Photo 4).

**Photo 4. Exemples de clichés d'échographie fœtale de lapine.**



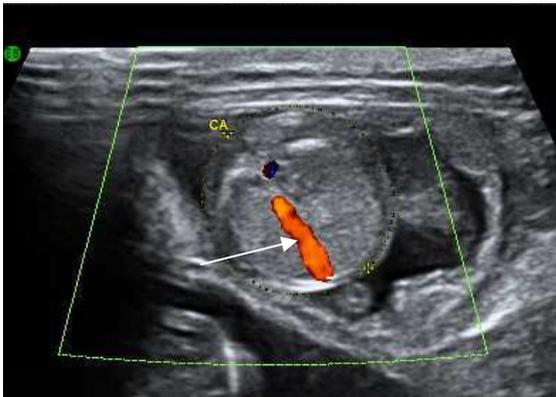
A. Placenta (flèche du haut) et embryon (flèche du bas) à J14. La mesure de l'épaisseur et de la largeur du placenta ainsi que la longueur cranio-caudale de l'embryon sont indiquées entre les croix.



C. Mesure du diamètre bipariétal (BIP) à J21



D. Membre avec vue passant par une patte à J21.



B. Mesure du périmètre abdominal à J21. Le vaisseau visible en mode Doppler (flèche) est la veine ombilicale qui sert de repère pour cette mesure.



E. Placenta à J21.

## **6. Autopsies et analyse histologique des aortes**

### **6.1. *Examen post mortem***

Après euthanasie, le foie, les reins, la graisse interscapulaire et périrénale ont été prélevés et pesés. La graisse péri rénale est connue comme étant un fidèle reflet de l'adiposité générale.

### **6.2. *Analyse des aortes***

Après laparotomie, l'aorte est exposée, les artères efférentes sont sectionnées. L'extrémité supérieure est la crosse aortique, et l'extrémité inférieure la bifurcation iliaque. Elle est alors ouverte en deux dans le sens longitudinal, et lavées dans du PBS. Après nettoyage et excisions des tissus graisseux l'aorte est fixée dans du formaldéhyde 1% pendant 24h à 4°C. Les aortes sont ensuite colorées avec de l'huile rouge pendant 1 heure, puis lavées dans l'éthanol 70% pendant 20 minutes. Les aortes sont alors examinées macroscopiquement pour rechercher les lésions d'athérosclérose.

Après fixation entre deux lames, les aortes sont photographiées. Les photos sont alors analysées à l'aide du logiciel Image J afin de quantifier la proportion de la surface aortique atteinte d'athérosclérose.



## **7. Analyses statistiques**

Les analyses des données longitudinales ont été faites à l'aide du logiciel SAS utilisant le Modèle "PROC Mixed" pour analyses répétées<sup>143</sup> avec les femelles et la durée d'expérimentation comme co-facteurs. Cette analyse a donné un résultat global ainsi que des analyses ponctuelles. Le test ANOVA ou le t test de Student ont été utilisés pour l'analyse des données post mortem à l'aide du logiciel XLStat 2008. Les analyses de comparaison de quantification de qRT-PCR ont été réalisées à l'aide du test t de Student. Un  $p < 0.05$  a été considéré comme statistiquement significatif. Tous les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (Erreur Type=SD/racine carrée de n).



**D. Expérience 1 : Effets d'un régime enrichi en lipides et en cholestérol HH ou C débuté en période pré pubertaire sur la mère, l'expression de gènes embryonnaires, le développement fœtal et la survenue de maladies à long terme**



L'objectif était d'évaluer le régime HH vs C débuté en période pré-pubertaire sur le développement embryonnaire, la gestation et la descendance.

## **1. Matériels et Méthodes**

### **1.1. Protocole expérimental (Figure 16)**

Les femelles ont été nourries soit avec l'aliment HH, soit avec l'aliment C, à partir de 10 semaines jusqu'à la fin de la période d'allaitement. La mise à la reproduction a été effectuée à l'âge de 18 semaines. Au cours de ce protocole expérimental, les lapines ont été réparties en 3 groupes.

a. 16 femelles (8 HH et 8 C) ont été euthanasiées à l'âge de 18 semaines pour évaluer l'effet du régime donné depuis l'âge de 10 semaines.

b. 30 lapines (16 HH et 14 C) ont été saillies naturellement à 18 semaines. La croissance fœtale a été surveillée par échographie à J9, J14, J21 et J28. 4 femelles HH et 2 femelles C ont été euthanasiées à J28 de la gestation (22 semaines d'âge) pour collecter les fœtus et les placentas.

c. Les 24 femelles restantes ont mis-bas naturellement. Les portées ont été équilibrées dès la naissance afin d'avoir des portées de 6 lapereaux, formant 4 sous groupes. Le sexe des lapereaux n'a pas été pris en considération.

HH: Hyperlipidique Hypercholestérolémique (SC0,2%)  
 VS  
 C: Contrôle

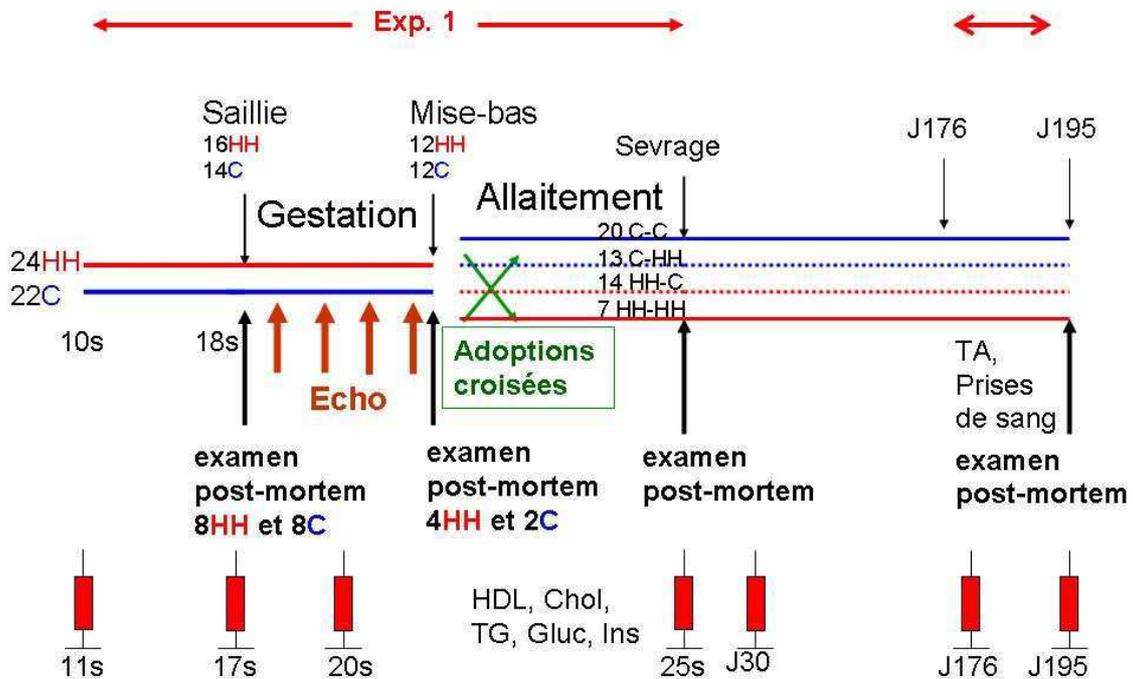


Figure 16. Protocole Expérimental. Expérience 1 : régime HH ou C débuté à 10 semaines, poursuivi jusqu'au sevrage puis régime HH repris à l'âge adulte pour tous les lapins (J176 à J195).

Les 4 sous groupes sont :

\*Descendants de mères nourries par le régime HH et allaités par une mère nourrie par un régime HH (HH-HH).

\*Descendants de mères nourries par le régime HH et allaités par une mère nourrie par un régime C (HH-C).

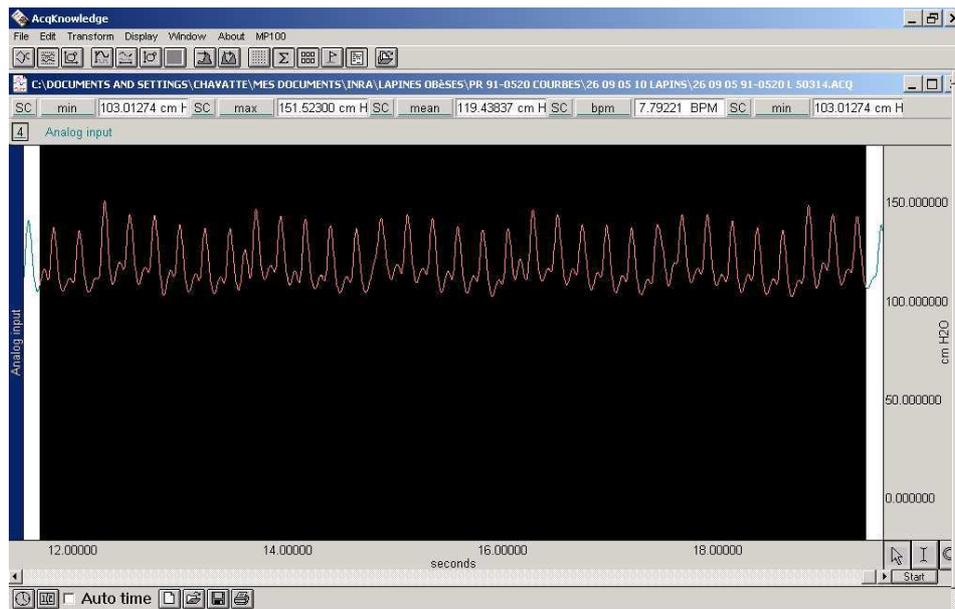
\*Descendants de mères nourries par le régime C et allaités par une mère nourrie par un régime HH (C-HH).

\*Descendants de mère nourries par le régime C et allaités par une mère nourrie par un régime C (C-C).

La croissance des lapereaux a été surveillée jusqu'au sevrage, moment où les animaux ont été euthanasiés (un mois d'âge). Un petit groupe de lapereaux (26) a été conservé pour surveillance à long terme. Ce groupe a reçu l'aliment C jusqu'à 176 jours, puis le régime HH jusqu'à 196 jours, moment de l'euthanasie. Dans ce groupe, le poids, la quantité d'aliments ingérés et la pression artérielle ont été mesurés de façon hebdomadaire.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés chez les mères à 11 semaines soit juste après la mise sous régime, à 17 semaines soit juste avant la mise à la reproduction, à 19 semaines soit à mi-gestation et 25 semaines (sevrage) avec dosages du cholestérol total, de l'HDL, des triglycérides, du glucose et de l'insuline.

Chez les descendants, ces dosages ont eu lieu à l'âge de 30, 171 et 196 jours.



**Photo 5. Enregistrement de la tension artérielle dans l'oreille d'une lapine (courbe rouge).**

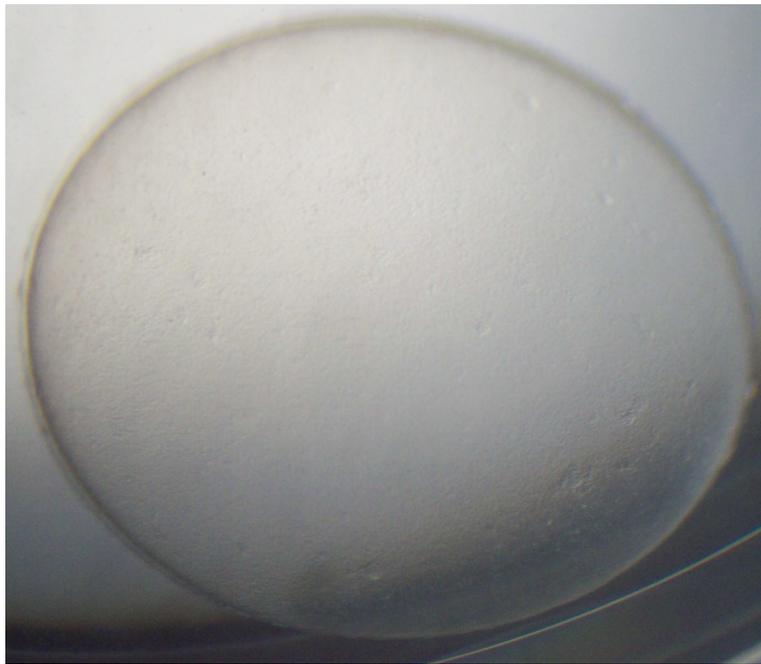
La zone sur fond noir est la sélection de la meilleure partie de la courbe. Suite à cette sélection s'affichent les tensions max., min. et moy. (en mmHg), en haut de l'écran.

## **1.2. *Mesure de la pression artérielle***

La pression artérielle a été mesurée au niveau de l'artère centrale de l'oreille sur des animaux non anesthésiés selon la méthode précédemment décrite<sup>144</sup>. Elle a mesurée chez es lapins alàage aduulte, à l'âge de 176 et 195 jours.

Un cathéter de 22G est alors placé dans l'artère de l'oreille (Photo 2). La tubulure d'acquisition connectée au capteur de pression est fixée a ce cathéter. La meilleure partie de la courbe d'acquisition (Photo 5) est sélectionnée et utilisée pour le calcul des valeurs minimales, maximales et moyennes de la tension de la lapine par un logiciel spécifique (AcqKnowledge, Biopack systems, Goleta, USA).

La valeur de tension artérielle moyenne normale issue des publications de Kate Denton est de 7,5mmHg (elle ne donne pas les valeurs systoliques et diastoliques)<sup>145</sup>.



**Photo 6. Embryon de lapin au stade Blastocyste (J5,5). Taille réelle 3 à 5mm.**



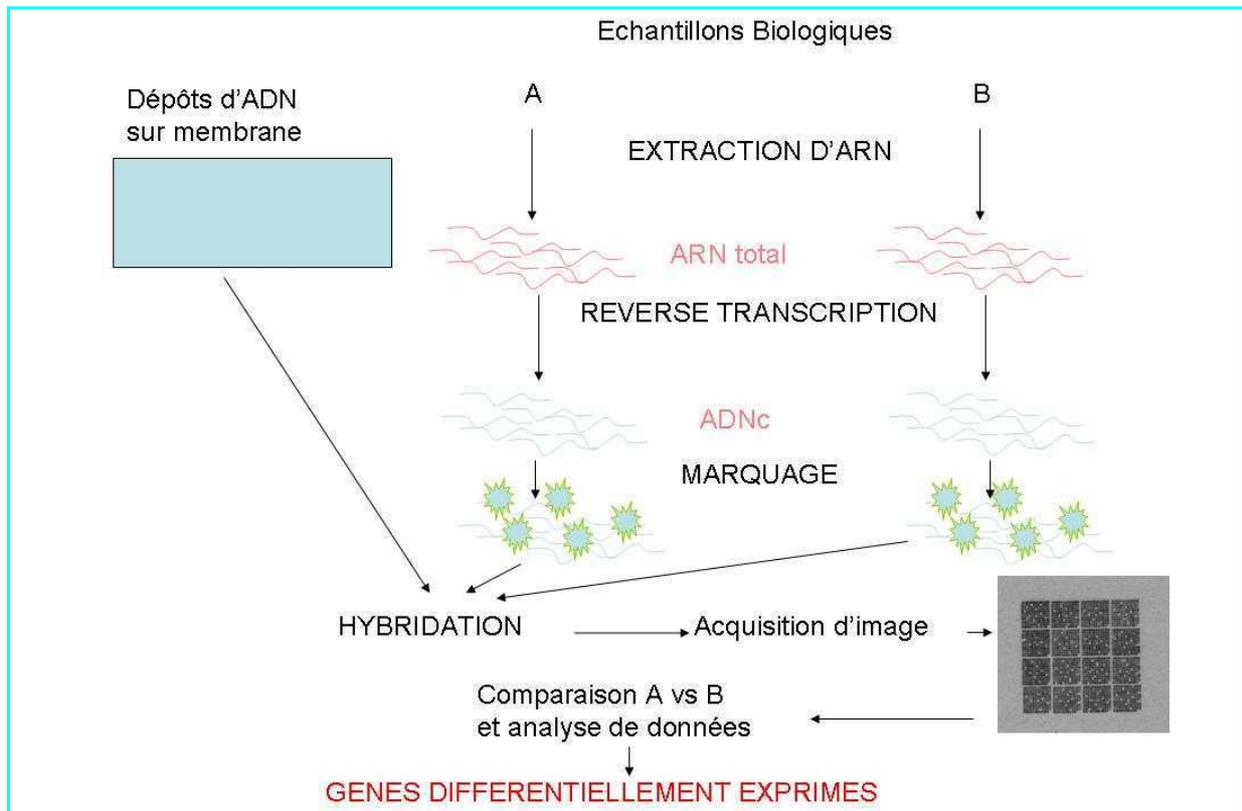
**Photo 7. Embryon de lapin au stade 48hPC : 16-20 cellules. Taille réelle : 0,5mm.**

### **1.3. Protocole de super ovulation et collecte d'embryons**

Les lapines ont reçu 5 injections sous cutanées de pFSH (Stimufol®, Merial, Lyon) pendant 3 jours avant la mise à la reproduction : deux injections de 5µg le premier jour à 12h d'intervalle, 2 injections de 10µg à 12h d'intervalle le deuxième jour, et une injection de 5µg le troisième jour, suivie 12h après d'une injection de 30UI d'HCG (Chorulon, Intervet) juste avant la saillie. Les embryons (soit à J2 soit à J5,5) ont été recueillis par flushing des oviductes avec du PBS immédiatement après l'euthanasie. Les embryons ont été répartis en deux groupes en fonction de leur morphologie par des personnes expérimentées pour homogénéiser ces groupes. Seuls les embryons de type « A », c'est-à-dire avec une morphologie normale (non fragmentés, réguliers, au bon stade de développement pour le terme) ont été utilisés pour l'analyse moléculaire. Les autres embryons n'ont pas été utilisés (Groupe "B"). Au sein des embryons issus de lapines C, on retrouve 321/402 embryons de type A soit 79,8%, contre 255/346 type A soit 73% au sein des embryons issus de lapines HH ( $p=0,04$ )( $p<0,05$ ).

Pour l'analyse transcriptomique, les lots de 20 embryons à J2 de type A ont été faits lapine par lapine de l'expérience 1 et congelés. Pour l'analyse en RT-PCR les embryons de Type A à J2 issus de plusieurs lapines ont tous été poolés puis congelés par groupes de 10 à -80°C jusqu'à utilisation alors que les embryons à J5,5 ont été photographiés et congelés individuellement (Photo 6). En effet à ce stade l'embryon est environ 10 fois plus volumineux qu'à J2 (Photo 7) et contient plus de 900 cellules<sup>146</sup>. Une analyse individuelle est donc possible à J5,5 alors que cela ne l'est pas à J2.

Pour l'analyse immuno histologique, les embryons ont été recueillis à J2 et J5, et triés selon les mêmes critères morphologiques.



**Figure 17. Principe d'analyse du transcriptome par criblage différentiel.**

Il s'agit de comparer le niveau d'expression de gènes au sein de deux échantillons, ici A et B.

## **1.4. Biologie moléculaire**

### *1.4.1. Le réseau dédié*

#### *Principe d'un réseau :*

La technologie des réseaux d'ADN consiste en la fabrication et l'utilisation de réseaux de milliers de séquences d'acides nucléiques, ADNc ou oligonucléotides fixés à des substrats solides tels que lames de verre ou filtres de nylon. Les réseaux permettent de mesurer simultanément l'expression de milliers de gènes d'un génome. Cette manière d'étudier l'expression du génome s'appelle l'étude du transcriptome. Les expériences utilisant les réseaux d'ADNc en vue de l'analyse d'au moins deux transcriptomes correspondent à des hybridations comparatives concernant des populations d'ARN accumulées dans différents tissus, à différents stades du développement ou soumis à différents traitements (Figure 17). On parle alors de criblage différentiel.

#### *Réseau utilisé :*

Le réseau utilisé pour nos expériences a été mis au point par Roger Léandri au cours de sa thèse dans le laboratoire : la technique d'hybridation suppressive soustractive a été utilisée pour construire deux banques de ADNc d'embryons de lapin enrichies en séquences exprimées lors de deux étapes clés du développement pré-implantatoire, l'activation du génome embryonnaire (TME) (stade 8-16 cellules chez le lapin) et l'apparition des premières différenciations cellulaires au stade blastocyste lors de la différenciation du trophoblaste alors que les cellules pluripotentes se trouvent au niveau de la masse cellulaire interne. La banque TME a été construite en soustrayant les ADNc du stade 4 cellules (avant la TME) de ceux d'embryons de stade morula précoce (16-32 cellules), stade suivant immédiatement

Protocole d'extraction à l'aide du RNeasy MINI KIT (QIAGEN, Courtaboeuf, France).

A chaque échantillon, correspondant à un lot d'embryons, est ajouté 350µl de tampon de lyse contenant 2% de B2 mercaptoethanol. Les tubes sont alors vortexés pendant 1 minute pour casser les membranes et homogénéiser. On ajoute alors le même volume d'éthanol 70%. On homogénéise par pipetage et on dépose la totalité du volume sur la colonne placée sur un tube de 2 ml puis on centrifuge 15 secondes à 8000g. On jette l'éluât et on remet la colonne sur le tube.

Nous avons utilisé une phase de traitement à la DNase (RNase free DNase set, QIAGEN, Courtaboeuf France): Ajout de 350µl de tampon RW1 sur la colonne. On centrifuge 15 secondes à 8000g, et on jette l'éluât. On place la colonne sur un tube conique et on ajoute 80µl de DNase diluée (10µl de DNase, soit 30UI + 70µl de RDD) et on incube à 25-30°C pendant 15minutes. On ajoute ensuite 350µl de RW1 sur la colonne, et on laisse agir 10 minutes à température ambiante. On centrifuge 15 secondes à 8000g et on jette l'éluât et le tube. On met alors la colonne sur le tube de 2 ml fourni par le kit. On dépose alors 500 µl de tampon RPE. On centrifuge 15 secondes à 8000g, on jette l'éluât et on remet la colonne sur le tube. On dépose à nouveau 500 µl de tampon RPE, on centrifuge 2 minutes à vitesse maximum pour sécher la colonne. On place alors la colonne sur un tube de 1.5 ml, on ajoute 30 µl d'H<sub>2</sub>O RNase «free », on laisse en contact une minute puis on centrifuge 1 minute à 8000g. Cette étape est réalisée deux fois pour un volume d'extraction total final de 60µl. Le produit d'extraction est alors conservé à -80°C.

la TME. La banque FD, pour First Differentiation, a été construite en soustrayant les ADNc du stade morula tardive (32-64 cellules) du stade blastocyste (Thèse Roger Léandri, Université Paris XI, 2009)<sup>129</sup>.

Une fois les 2 banques établies, elles ont été séquencées et comparées entre elles et avec des banques de données d'EST de lapin afin d'assembler leurs EST en contigs. Pour chacun des contigs obtenus, l'ADNc le plus représentatif (en terme de couverture du contig) a été identifié. 2000 représentants de ces contigs ont été déposés sur une micromembrane de nylon. Ceci constitue un réseau dédié à la période embryonnaire pré-implantatoire d'environ 2000 gènes uniques. L'ensemble des gènes ont été classés en 7 clusters en fonction de l'évolution de leur expression aux stades 4 cellules, morula et blastocyste. Une analyse fonctionnelle a également été réalisée à l'intérieur de chaque cluster. Le métabolisme du cholestérol n'apparaît que pour 4 gènes d'un des clusters. Au total, seulement une vingtaine de gènes ont un rapport avec le métabolisme lipidique et le métabolisme du cholestérol.

#### 1.4.2. *Analyse du transcriptome par le réseau dédié*

L'ARN total a été extrait de 4 lots indépendants de 20 embryons recueillis à 48h post-coïtum, sur des lapines ayant subi chaque régime, après super ovulation, à l'aide du RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant (voir ci-dessous). Pour cette analyse, les 20 embryons de chaque lot provenaient d'une même lapine. Plusieurs lots ont été utilisés pour pallier la variabilité entre lots et la variabilité de la technique. Le nombre d'embryons par lot était de 20 car la quantité d'ARN par embryon est faible (2,5 à 5ng d'ARN total par embryon à ce stade). Au stade J5,5, nous avons réalisé la même méthode d'extraction que pour les stades précoces. La seule différence étant l'absence d'utilisation de carrier car les ARN sont présents en plus grande quantité à ce stade.

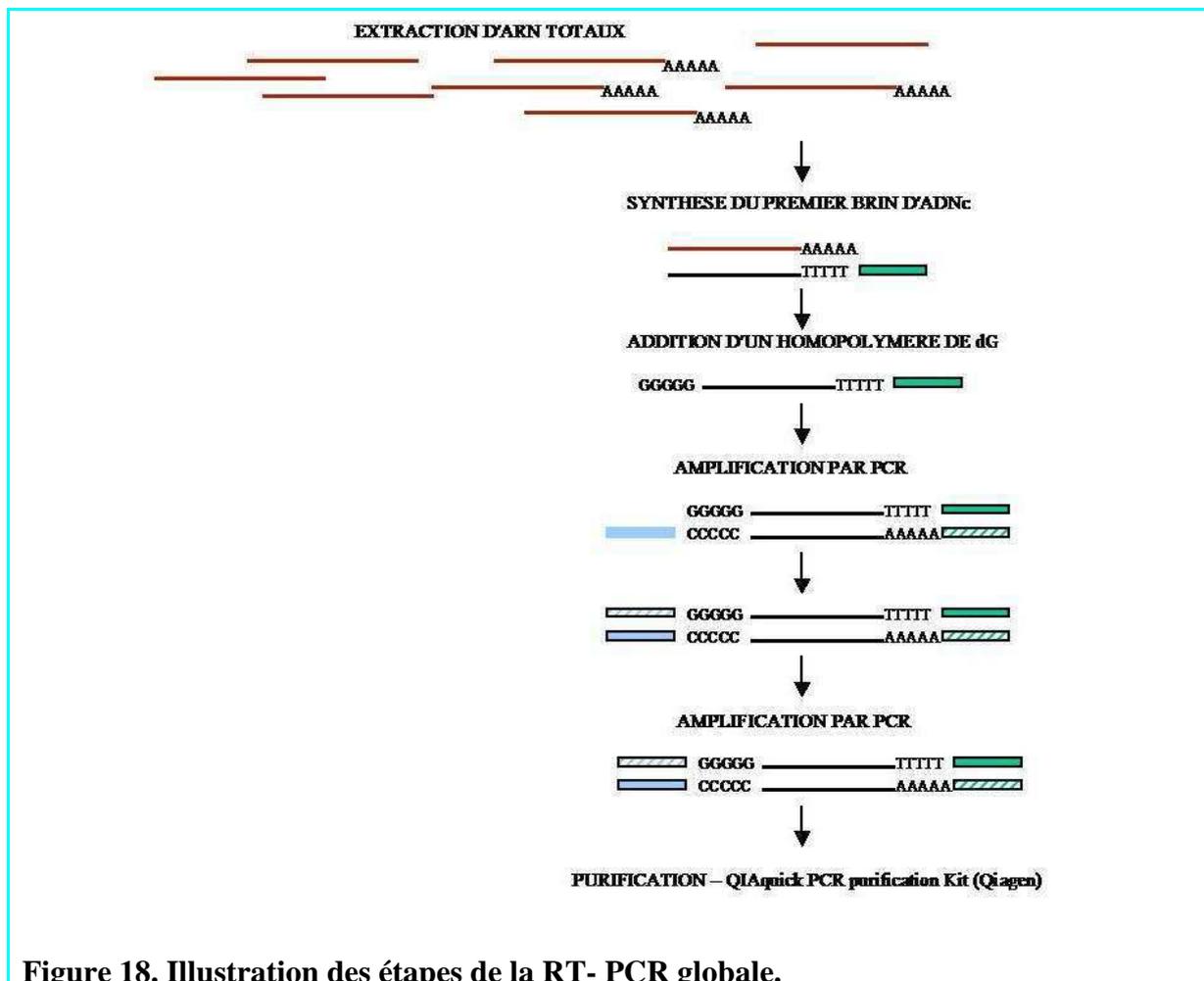


Figure 18. Illustration des étapes de la RT- PCR globale.

Chaque produit d'extraction a ensuite été amplifié par deux procédures indépendantes : une amplification exponentielle par reverse transcription (RT) et PCR globale et une amplification linéaire par transcription in vitro aboutissant à la synthèse d'ARN antisens (ARNa). Il a été montré dans le laboratoire que l'utilisation sur chaque échantillon de ces deux procédures permet d'évaluer les effets des méthodes d'amplification et de détecter un plus large spectre de gènes différentiellement exprimés avec un nombre d'échantillons plus faible que lors de l'utilisation d'une seule méthode (Thèse LC Bui, Université Paris XI, Année 2007).

#### *RT-PCR globale*

L'objectif de la RT-PCR globale est d'amplifier de façon exponentielle tous les ARN qui ont été extraits et dont le principe est rappelé en Figure 18.



La composition des mix RT, Tailing et PCR1 est détaillée ci dessous, les quantités indiquées correspondent à 1 tube et sont exprimées en  $\mu\text{l}$ .

Mix RT: réactif (concentration initiale):

dNTP (1mM)	0,2	
Amorce		
Tc (7.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0,087	5'-GCG-CCG-CGG-CCG-CTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T-3'
DTT (0.1mM)	0,25	
Tampon 5x RT	0,93	
RNasine (40U/ $\mu\text{l}$ )	0,25	
H <sub>2</sub> O	0,25	

Mix Tailing : réactif (concentration initiale):

H <sub>2</sub> O	1,6
dGTP (20mM)	0,4
Tampon 5x TdT	2
Tdt enz (terminale deoxynucleotidyl transferase)(15U/ $\mu\text{l}$ )	1

Mix PCR 1 : réactif (concentration initiale):

Tampon 10X	5	
Amorces:		
Tc (10pmol/ $\mu\text{l}$ )	1	5'-GCG-CCG-CGG-CCG-CTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T-3'
Cc (10pmol/ $\mu\text{l}$ )	1	5'-GCC-GTC-GAC-GCG-TCC-CCC-CCC-CCC-C-3'
Ttr (20pmol/ $\mu\text{l}$ )	4,5	5'-GCC-GTC-GAC-GCG-TCC-3'
Ctr (20pmol/ $\mu\text{l}$ )	4,5	5'-GCG-CCG-CGG-CTT-3'
BSA (1mg/ml)	8,5	
H <sub>2</sub> O	11,25	
Taq Gold Star (5U/ $\mu\text{l}$ )	3	

Mix PCR 2 : réactif (concentration initiale) :

Tampon 10X	5
Amorces	
Ttr 20 pmol/ $\mu\text{l}$	5
Ctr 20 pmol/ $\mu\text{l}$	5
dNTPs 20mM	1,25
BSA 1mg/ml	8,5
H <sub>2</sub> O	9,75
Taq Gold start	3

Protocole de RT :

Il faut commencer par vortexer le mix de RT, puis centrifuger 30 secondes à 12800g. Dans un tube de 0,5ml, déposer 2 $\mu\text{l}$  d'ARN et 2 $\mu\text{l}$  de mix de RT. On chauffe 2 minutes à 65°C, puis on centrifuge à nouveau 30 secondes à 12800g. On laisse alors reposer à température ambiante pendant 3 minutes puis on place sur glace.

Pendant ce temps on prépare le mix d'enzymes de RT. Pour cela il faut diluer l'Avian Myeloblastosis Reverse Transcriptase (AMV RT, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) (15U/ $\mu\text{l}$ ) en en prenant 0,5 $\mu\text{l}$  auquel on ajoute 2,5 $\mu\text{l}$  de mix RT. On prend 0,4 $\mu\text{l}$  de ce mélange auquel on ajoute 0,5 $\mu\text{l}$  de Superscript II. Le mélange contient donc deux enzymes de transcription inverse. On dépose alors 0,9 $\mu\text{l}$  de ce mix d'enzymes dans chaque tube et on mélange délicatement sans faire de bulle. On place les échantillons 30 minutes à 42°C puis 10 minutes à 65°C. On termine par une centrifugation de 30 secondes à 12800g.



Protocole de Tailing :

On ajoute la TdT (1µl à 15U/µl) (Terminal deoxynucleotidyl Transferase, Promega, Charbonnières, France) au mix de tailing et l'on vortexe délicatement. On centrifuge 30 secondes à 12800g. On ajoute 5µl de ce mélange par tube, avec un pipetage doux. On laisse alors le mélange 1 h à 37°C, puis 10 minutes à 65°C. On termine par une centrifugation 30 secondes à 12800g.

PCR 1 :

On ajoute la Taq ADN polymérase au mix PCR et on vortexe légèrement. On centrifuge 30 secondes à 12800g, on ajoute dans chaque tube de produit de RT 40µl de mix PCR avec un pipetage doux et on place une goutte d'huile en surface. Le programme utilisé pour la PCR est le suivant: 94°C pendant 10 minutes puis 15 cycles à 96°C pendant 2 minutes, 63°C pendant 50 secondes et 72°C pendant 6 minutes. En fin de PCR la température redescend à 4°C.

PCR 2 :

On vortexe légèrement le mix PCR2, puis on centrifuge 30 secondes à 12800g. On prélève 37,5 µl de mix PCR2 dans lequel on dépose 12,5µl de produit de PCR1. On homogénéise par un pipetage doux. On centrifuge alors 8 minutes à 12800g. On place une goutte d'huile et on centrifuge 3 minutes à 12800g. On place alors les tubes sur la plaque de la machine PCR selon le programme suivant : 15 cycles à 96°C pendant 2 minutes, 63°C pendant 50 secondes et 72°C pendant 6 minutes. En fin de PCR la température redescend à 4°C.

Les produits de PCR obtenus sont purifiés à l'aide du Kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Purification de l'ADN amplifié par le kit QIA quick purification kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France):

Ajout de 5 volumes de Tampon PB à 1 volume d'échantillon de PCR puis dépôt sur la colonne placée sur un tube de 2ml. Il faut alors centrifuger pendant 30-60 secondes à 10000g. On jette l'éluate et on remet la colonne sur le tube, puis on ajoute de 75µl de tampon PE sur la colonne. Il faut à nouveau centrifuger 30-60 secondes à 10000g, on jette l'éluate, puis on centrifuge 1 min à vitesse maximum. On jette l'éluate, on place la colonne sur un tube de 1,5ml, on ajoute 30µl d'H<sub>2</sub>O sur la membrane au centre de la colonne et on laisse une minute en contact. Enfin, on centrifuge 1 minute à 10000g. On répète à nouveau avec 30µl d'H<sub>2</sub>O pour obtenir un volume d'extraction total de 60µl et améliorer le rendement d'extraction. On conserve le produit purifié à -20°C.

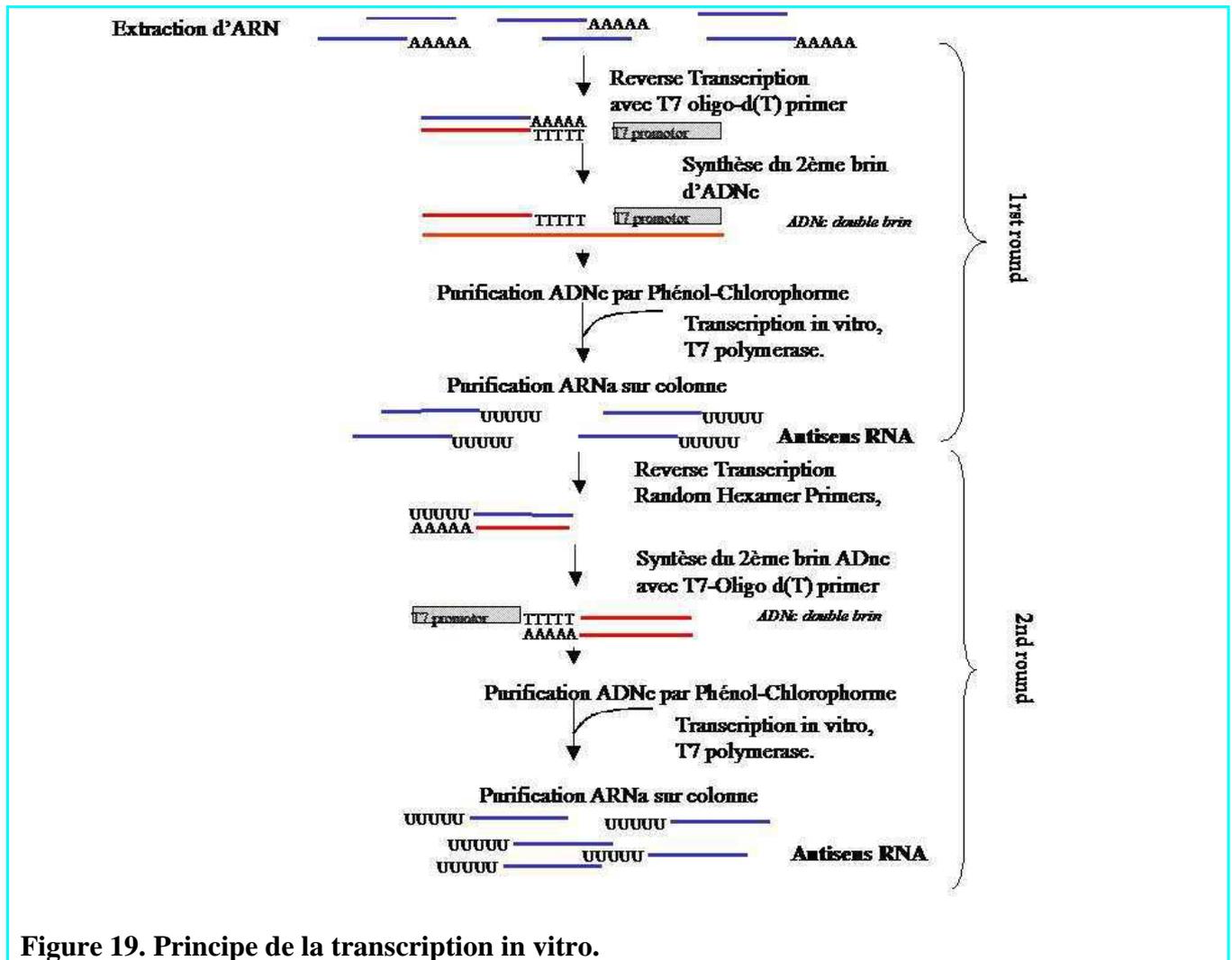


Figure 19. Principe de la transcription in vitro.

*Transcription in vitro* : Il s'agit de transformer l'ARN extrait en ADNc par une transcription inverse, Le principe est rappelé en Figure 19.

Protocole d'ARNa Transcription in vitro MessageAmp ARNa Kit (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France):

Synthèse du 1<sup>er</sup> brin d'ADNc : On ajoute 1µl d'amorces T7 oligo d(T) et 12µl d' H<sub>2</sub>O aux ARN. Le mélange est incubé 10 minutes à 70°C, puis vortexé et placé sur glace. On réalise un mix à température ambiante contenant (pour chaque tube) : 2µl de Tampon de RT 10X, 1µl de Ribonucléase inhibitor, 4µl de dNTPmix et 1µl de reverse transcriptase. On mélange ce mix et on centrifuge brièvement. On ajoute 8µl de ce mix dans les tubes qui ont été placés sur la glace, on agite, on centrifuge brièvement et on place 2h à 42°C au bain marie.

Synthèse du 2<sup>ème</sup> brin d'ADNc : Sur glace : on ajoute à 20µl d'ADN simple brin obtenu précédemment 63µl d'H<sub>2</sub>O, 10µl de tampon 10X « second strand buffer », 4µl de dNTPmix, 2µl de ADN polymerase, 1µl de RNase H. On mélange puis on centrifuge et on laisse au bain marie 2h à 16°C.

Purification de l'ADNc : préparation de la colonne « phase lock gel » par centrifugation : on ajoute 100µl de phenol/chloroforme à la colonne et on vortexe 1 minute. On dépose ensuite 200µl du produit issu de la synthèse du 2<sup>ème</sup> brin sur la colonne et on centrifuge 5 minutes à 16000g. On prélève la phase aqueuse et on précipite l'ADNc en ajoutant 2µl de glycogène à 5µg/µl, 50µl de NH<sub>4</sub>Oac 5M froid, et 375µL d'éthanol 100% froid. On laisse ce mélange 2h à -20°C, on centrifuge 20 minutes à 16000 g à 4°C, on jette le surnageant. On rince le culot en ajoutant 500µl d'éthanol 70° froid. On centrifuge alors 10minutes à 16000 g à 4°C et on jette le surnageant. On sèche le culot sous lampe et à l'aide d'un bloc chauffant à 25°C. On met ensuite en suspension ce culot obtenu dans 16µl d'H<sub>2</sub>O, on place 10 minutes à température ambiante avec agitation et centrifugation rapide.

In vitro transcription (ARNa) : On prend 16µl d'ADNc double brin purifié. Par tube, on ajoute un mix composé de 4µl de chacun des produits suivant : T7 ATP soln (75 µM), T7 GTP soln (75 µM), T7 UTP soln (75 µM), T7 CTP soln (75 µM), T7 tampon de réaction 10X, T7 mix d'enzyme. On mélange puis on centrifuge. On laisse alors le mélange 14h à 37°C. On ajoute ensuite 2µl de DNase 1, on mélange et on laisse 30 minutes à 37°C au bain marie. Puis on ajoute 60µl de solution d'éluion.

Purification ARNa : on ajoute au produit obtenu 350µl de tampon de fixation ARNa, on mélange puis on ajoute 250µl d'éthanol 100%. On dépose 700 µL de produit obtenu sur filtre, on centrifuge 1 minute à 10000g, et on jette l'éluât. On ajoute 750µl de tampon de lavage, on centrifuge 1 minute à 10000g, on jette l'éluât. On transfère le filtre dans un nouveau tube de 2ml et on réalise l'éluion avec de l'H<sub>2</sub>O nuclease free chauffée à 50°C : on laisse le filtre et l'eau en contact pendant 2 minutes à température ambiante, puis on centrifuge 1 minute à 10000g. On recommence exactement la même opération avec à nouveau 50µl d'H<sub>2</sub>O, et centrifugation 1 minute à 10000g. Le produit d'éluion est quantifié par mesure de la densité optique à 260nm puis congelé à -80°C.



### *Marquage des sondes amplifiées ADNc :*

Il faut dénaturer les brins d'ADNc et utiliser des amorces aléatoires (hexamères) qu'une ADN polymérase va utiliser pour se fixer et synthétiser un nouveau brin d'ADN en utilisant les nucléotides présents dans le milieu de réaction dont l'un est marqué par la radioactivité.

#### Marquage des sondes amplifiées ADNc:

Il faut mettre 500ng d'ADNc obtenu précédemment dans un tube eppendorf 0,5ml. On ajoute 1µl de random primer9 (Biolabs, ref 512545) à 412,5ng/µl et on complète avec de l'eau pour obtenir un volume total de 32 µl. On réalise alors une phase de dénaturation pendant 8 minutes à 95-100°C.

Pendant cette phase de dénaturation, on réalise un mix composé pour chaque tube de: 5µl de tampon NEB 10X, 5µl de mix dNTP(-dATP) 10mM, 5µl de dATP<sup>33</sup>, 2,5 µl d'H<sub>2</sub>O.

Après la phase de dénaturation, on mélange les tubes et on centrifuge très rapidement. On laisse incuber 2-3 minutes à 50°C. On ajoute au mix de marquage 4 µl d'ADN polymérase, fragment de Klenow (5U/µl). Après 3 minutes à 50°C on ajoute le mix marquage additionné d'ADN polymérase à chaque tube et on place à 50°C pendant 30 minutes. On arrête ensuite la réaction en ajoutant 2µl d'EDTA à 0,5 M dans chaque tube.

On place ensuite les tubes dans de la glace ou à -4°C.

Purification de la sonde marquée sur colonne de G50 Sephadex: On ajuste 1ml de G50 dans une seringue de 1ml. On rince la colonne avec 1ml d'eau milliQ. On centrifuge cette colonne 2 minutes à 0,1g. On rince à nouveau la colonne avec 150µl d'H<sub>2</sub>O milliQ et on centrifuge à nouveau 2 minutes à 0,1g. Il faut renouveler l'opération jusqu'à obtenir 150µl en sortie de colonne. On ajoute alors 52µl de sonde marquée et 98µl d'H<sub>2</sub>O milliQ. On centrifuge la colonne 2 minutes à 9,3g. On prend alors 1µl des 150µl d'éluât auquel on ajoute 2ml de liquide scintillant et après 10 minutes de mise en contact on mesure la radioactivité. On congèle alors les sondes ainsi synthétisées.



### *Marquage des sondes ARNa :*

L'objectif est de reverse transcrire l'ARNa obtenu en ADNc en utilisant des nucléotides radioactifs.

#### Marquage des sondes

Synthèse de la sonde marquée: Mettre 500ng d'ARNa dans un tube eppendorf 0,5ml. On ajoute 1µl d'hexamères à 500ng/µl et on complète avec de l'eau pour obtenir un volume total de 25µl. On incube 10 minutes à 70°C puis on place sur glace.

Marquage de la sonde: On réalise un mix de marquage contenant, pour chaque tube : 10µl de tampon de RT 5X, 5µl de DTT0,1M, 2,5µL de mix dNTP(-dATP) 10mM, 2,5µl d' H<sub>2</sub>O. On ajoute 20µl de ce mix à chaque tube auquel on ajoute 5µl de alpha dATP<sup>33</sup>P. On homogénéise puis on incube 5 minutes à 25°C. On ajoute 1µl de superscript II Reverse Transcriptase à 200U/µl par tube. On réalise alors un cycle de 10 minutes à 25°C puis 50 minutes à 42°C et 15 minutes à 70°C (Thermocycler Biometra). On peut alors passer à 4°C puis ajouter 1µl de RNase H à 2U/µl, et on laisse incuber 20 minutes à 37°C (Thermocycler Biometra). On place ensuite les tubes dans de la glace.

Purification de la sonde marquée sur colonne de G50 Sephadex: On ajuste 1 ml de G50 dans une seringue de 1ml. On rince la colonne avec 1ml d' H<sub>2</sub>O milliQ. On centrifuge cette colonne 2 minutes à 0,1g. On rince à nouveau la colonne avec 150µl d'H<sub>2</sub>O milliQ et on centrifuge à nouveau 2 minutes à 0,1g. Il faut renouveler l'opération jusqu'à obtenir 150µl en sortie de colonne. On ajoute alors 52µl de sonde marquée et 98µl d' H<sub>2</sub>O milliQ. On centrifuge la colonne 2 minutes à 9,3g. On prend alors 1µl des 150µl d'éluât auquel on ajoute 4µl de liquide scintillant et après 10 minutes de mise en contact on mesure la radioactivité. On congèle alors les sondes ainsi synthétisées.

### *Hybridation des sondes marquées avec la membrane :*

Le principe est d'hybrider les acides nucléiques présents sur la membrane avec les ADNc marqués issus des échantillons.

Préhybridation: Il faut commencer par humidifier avec de l'eau milliQ la membrane de nylon. Elle est ensuite déposée sur une feuille de papier pour absorber l'excès d'eau milliQ et placée dans un tube en verre de 12ml (spots vers l'extérieur du tube). On y ajoute 2ml de tampon Clontech préchauffé à 68°C. On place alors le petit tube dans un grand tube en verre Hybaid et on réalise la préhybridation en laissant la membrane à 68°C pendant 48h.

Hybridation : Pour dénaturer les sondes, on fait bouillir 150µl de produit obtenu précédemment pendant 3 minutes puis on place 2 minutes dans la glace. Après une centrifugation de 30 secondes à 1000g on place le total dans le tampon de préhybration, et on hybride au four à 68°C pendant 24h.

Lavage: Laver par 4 fois la membrane en ajoutant dans le petit tube 10ml la solution 2X SSC, 1% SDS préchauffé à 68°C sous agitation douce, pendant 30 minutes puis une fois avec 10ml de solution 0,1X SSC 0,5% SDS pendant 30 minutes. Rincer en bac les membranes dans du SSC 2X. Les faire sécher sur du papier Whatman propre.

Exposition en cassette Fujifilm : Exposer les filtres en cassette pendant une nuit, en ayant pris soin de faire un plan de disposition des membranes. Puis scanner l'écran au Fuji Bas 5000. L'exposition peut durer jusqu'à 72 heures si nécessaire.



### *Analyse des résultats*

Les signaux ont été quantifiés grâce au logiciel AGScan (<http://mulcyber.toulouse.inra.fr/projects/agscan/>) avant analyse statistique par Analyse de variance. Après quantification, les signaux d'hybridation ont été transformés en log et normalisés avant analyse. Pour cela nous avons travaillé sur des données centrées réduites. Cela revient à considérer que la somme des signaux totaux de chaque membrane est identique à celle de n'importe quelle autre membrane et que les écarts entre les signaux forts et faibles sont de même ampleur quelle que soit la condition. L'analyse différentielle a été réalisée par un test ANOVA avec le logiciel GenAnova<sup>147</sup>. Pour chaque sonde du réseau, l'équation utilisée était la suivante :

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + M_j + R_k + \varepsilon_{ijk}$$

où  $Y_{ijk}$  est l'intensité de la sonde du réseau et  $\mu$  la moyenne des intensités exprimées mesurées par la sonde.  $D_i$ ,  $M_j$  et  $R_k$ , sont respectivement l'effet du régime  $i$ , la méthode d'amplification  $j$ , et les répétitions biologiques  $k$ .  $\varepsilon_{ijk}$  est le risque d'erreur résiduel comprenant l'interaction de tous ces facteurs.

#### *1.4.3. Slot Blot*

Principe : Une fois des gènes candidats obtenus, nous avons tenté de vérifier la différence d'expression entre les conditions expérimentales par une étape intermédiaire d'hybridation des sondes candidates sur le matériel amplifié correspondant aux embryons de chaque condition. Il s'agit de déposer sur une membrane une préparation d'ADNc issue des échantillons à analyser. On hybride ces dépôts avec des sondes spécifiques radiomarquées de l'ADNc que l'on cherche à analyser. Après révélation, on mettra en évidence des bandes plus ou moins intenses en fonction de la concentration de l'ADNc d'intérêt dans l'échantillon.



Nous avons déposé sur une membrane Brightstar<sup>TM</sup>-Plus (Ambion) les ADNc issus de la RT-PCR globale précédemment décrite, obtenus à partir d'ARN extraits de lots d'embryons, puis nous avons préparé les sondes correspondant aux gènes d'intérêts.

Pour les gènes choisis, nous avons réalisé une extraction des plasmides à partir des clones qui ont constitué le réseau et qui contenaient les séquences candidates. La purification de plasmide avec le kit Wizard plus (Promega, Charbonnières, France) a pour objet l'extraction rapide d'un plasmide (<20000 pb) d'une bactérie hôte avec une pureté suffisante pour séquençage, ligation ou PCR.

Une fois les plasmides extraits et purifiés selon les recommandations du fabricant (Kit WIZARD plus (Promega, Charbonnières, France).), il faut réaliser une amplification par PCR des inserts plasmidiques puis synthétiser les sondes radioactives.



Protocole PCR plasmidique : L'enzyme utilisé pour l'amplification est la Taq de chez QBiogen. Le mix est composé de 39,8µl d'H<sub>2</sub>O, 5µl de tampon 10XMgCl<sub>2</sub>, 1µl d'amorces NP1 et NP2 à 10µM, 2µl de dNTPmix (10nM) et 0,2µl de Taq. On y ajoute 1µl de plasmide concentré à 50ng/µl. Le programme de PCR est le suivant : 94°C pendant 5 minutes, puis 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 66°C et 1 minute à 72°C. On réalise une purification des produits de PCR à l'aide du kit PCR purification (QIA quick purification kit, Qiagen, Courtabeuf, France). On termine par 10 minutes à 94°C avant stockage à 4°C.

Pour la synthèse des sondes radioactives, on utilise le kit Rediprime de Amersham. On part de 50ng de matrice issue de la PCR. On y ajoute le TE à pH8 pour un volume total de 47µl. Une phase de dénaturation à 100°C pendant 2 minutes est réalisée avant de placer le tube 2 minutes dans la glace et de centrifuger. La totalité du volume est transféré dans un tube Rediprime, remis en suspension et on y ajoute le déoxynucléotide radioactif : 3µl de dTCP P<sup>32</sup>. On incube 15 minutes à 37°C puis on place sur glace.

Il faut également préparer une colonne de sephadex 50 dans un tampon TE pH8 puis rincer cette colonne avec 1ml de tampon TE pH8. Il faut garder cette colonne humide en mettant un morceau de parafilm à la sortie de la colonne.

Préhybridation de la membrane : il faut insérer la membrane dans le tube, en prenant soin de placer les dépôts d'ADN vers l'intérieur de celui-ci. On ajoute alors 5 millilitres de tampon ExpressHyb (Clontech-Takara Europe, St Germain en laye, France), et on place le tout dans le four à hybrider à 68°C pendant 30 minutes.

Séparation de la sonde : sur la paillasse de radioactivité il faut mettre les 50 µl de sonde sur la colonne cephadex G50, éluer avec 250 µl de Tampon d'élution TE fourni dans un tube falcon de 15ml (Fraction 1). On place alors la colonne dans un nouveau falcon et on élue de nouveau avec 300µl de TE (Fraction 2). On effectue alors un comptage de cpm/min au compteur B de la fraction 2 en mettant 3µl de cet éluât dans un tube spécifique. L'hybridation de la membrane se fait avec 10<sup>6</sup> cpm/ml de tampon.

Hybridation : on commence par dénaturer le volume nécessaire de sonde pendant 5 minutes à 100°C. On met alors la sonde radioactive directement dans le tube à hybridation sans enlever le tampon de pré-hybridation. On met à hybrider toute une nuit à 68°C. Le lendemain il faut rincer la membrane en réalisant 3 rinçages : le premier 30 minutes à 65°C avec du SSC2X contenant 0,1% de SDS, puis deux autres de 15 minutes à 65°C avec du SSC0,2X à 0,1% SDS. Après cela on retire la membrane du tube d'hybridation et on la laisse sécher très légèrement sur un kleenex, on la scelle sous plastique et on réalise l'exposition dans une cassette.



## 1.5. Quantification de l'ARN de gènes embryonnaires

Nous avons quantifié l'ARN des gènes mis en évidence par l'analyse du réseau par PCR quantitative en utilisant le SYBRgreen. Le SYBR green est un agent qui est non fluorescent lorsqu'il est libre, mais qui le devient lorsqu'il est intercalé entre deux brins d'ADN. Lorsqu'il est excité à une longueur d'onde de 494nm il va émettre à une longueur d'onde de 521nm.

### 1.5.1. Extraction de l'ARN

#### *Méthodologie utilisée :*

Pour cette partie de nos travaux, l'ARN total a été extrait avec le kit Picopure<sup>TM</sup> (Arcturus, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) en suivant le protocole du fournisseur. Ce kit utilise un support de silice qui a une haute force ionique permettant de fixer les acides nucléiques qui, après rinçages, seront ensuite élués grâce à un solvant à faible force ionique. Il permet de réaliser des extractions sur des échantillons contenant de faibles quantités d'ARN.

Il peut exister des différences de rendement de l'extraction et RT entre les différents échantillons. La normalisation est une étape permettant de prendre en compte ces différences. Pour cela on peut quantifier le transcrit d'un gène dit « rapporteur » présent au sein du tissu pour lequel on est certain que les conditions expérimentales n'ont pas d'influence, ou utiliser un rapporteur exogène. Ce rapporteur exogène n'existe pas dans le tissu analysé et ne peut donc pas être influencé par les conditions expérimentales. Au début de cette thèse, il n'y avait pas de gène rapporteur stable connu chez le lapin. Depuis, Mamo et al., ont décrits trois gènes qui pourraient servir de gènes rapporteurs : Ywhaz, H2afz et Hprt1<sup>148</sup>. Cependant, il existe des différences pour ces gènes en fonction des conditions in vivo ou in vitro et il n'est pas démontré que le régime alimentaire que nous utilisons n'a pas d'effet sur ces gènes. De ce fait, nous avons donc décidé d'utiliser un rapporteur exogène dont on est sûr qu'il ne sera pas modifié par les conditions expérimentales.



Dans le cadre de cette thèse nous avons choisi d'utiliser la luciférase comme décrit précédemment dans notre laboratoire<sup>149</sup>. Nous pouvons contrôler précisément la quantité de transcrit de luciférase introduite dans l'échantillon, puis faire le rapport entre la quantité du transcrit d'intérêt et la quantité mesurée du rapporteur.

Le rendement de l'extraction est contrôlé par mesure de l'absorbance à 260nm d'un aliquot de chaque échantillon (Nanodrop). La quantité d'ARN embryonnaire est négligeable comparée à la quantité de carrier. Le fait de connaître la quantité de carrier récupéré par rapport à ce qui était mis au début permet de connaître le rendement de l'extraction. Ainsi, nous avons évalué que 50 à 80% de l'ARN avait été récupéré.

### 1.5.2. *Reverse Transcription :*

Il s'agit de transformer les ARN obtenus après extraction du tissu à analyser en ADNc monocaténaire grâce à l'action d'une transcriptase inverse.

L'amorçage d'une RT peut se faire par un oligo dT, des amorces aléatoires ou des amorces dessinées pour un gène spécifique. Les molécules obtenues servent alors de matrice à une réaction de PCR. Nous avons utilisé une méthode avec traitement des échantillons avec une désoxyribonucléase et avec des amorces aléatoires.

#### **Protocole de RT :**

Pour chaque tube, le volume d'échantillon utilisé dépend du résultat de l'extraction. On y ajoute 1µl de « random primers » (amorces aléatoires) et on complète avec de l'eau pour obtenir un volume total de 12µl. On place alors les tubes sur une plaque chauffante à 65°C pendant 5 minutes. On termine en plaçant les échantillons 5 minutes dans la glace. On ajoute alors à chaque tube 8µl de mix de RT composé de Tampon 5X (4µl), DTT 0,1 (1µl), dNTP10nM (1µl), RNase inhibiteur (1µl) et Superscript 3(1µl). Les tubes sont alors placés 5 minutes à 25°C au bloc chauffant puis 1h à 50°C au bain marie et 15 min à 70°C sur plaque. Le volume des échantillons est alors réajusté afin d'obtenir une préparation contenant le maximum d'ARN d'embryon par 10µl. Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C.

Les contraintes pour dessiner les amorces sont les suivantes :

Taille de l'amplicon de 200 à 300 paires de bases

Ne pas contenir de séquences inversées répétées qui entraîneraient un repliement de l'amorce sur elle-même

Etre spécifiques de l'amplicon souhaité, avoir une température d'hybridation correcte (entre 50 et 60°C) et proche pour les deux amorces. La température d'hybridation détermine la stabilité des hybrides une fois l'appariement amorce-matrice réalisé. La température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides des amorces. Cette température est légèrement inférieure (de 5°C) au  $T_m$  qui est la température de demi-dénaturation

% de GC de l'ordre de 40 à 50% afin d'avoir une dénaturation plus facile.

### 1.5.3. *Dessin des amorces ou « primers »*

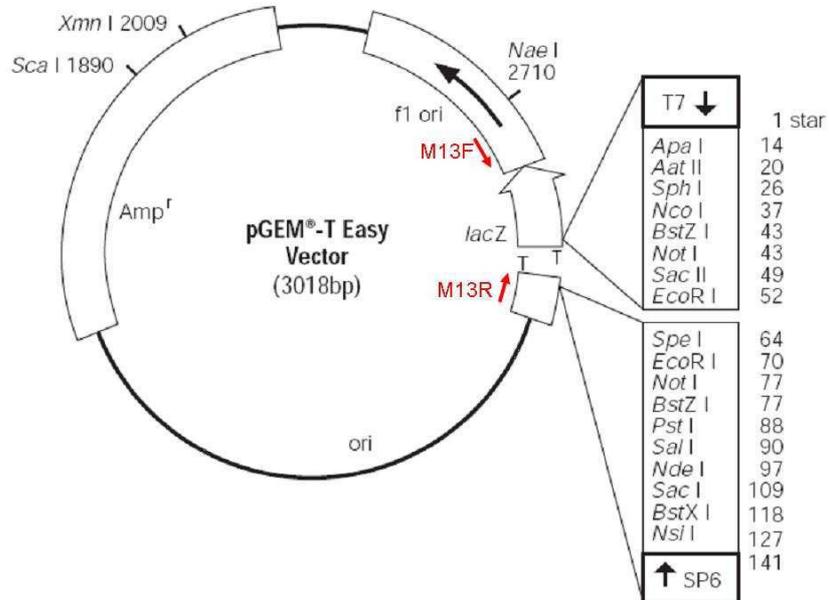
Les amorces ont été dessinées grâce au logiciel Primer Express (Applied Biosystem) à partir de la séquence des inserts de ADNc.

Les amorces ont ensuite été testées sur ADNc de fibroblaste et de foie de lapin. En parallèle, les plasmides ont été utilisés comme témoins positifs de PCR. On a alors fait migrer le produit de PCR et un marqueur de poids moléculaire (ladder) sur gel. Ainsi, on a pu vérifier qu'elles amplifiaient bien la séquence voulue.

### 1.5.4. *Constitution des gammes*

Une gamme constituée de solutions de la molécule d'intérêt en concentrations croissantes (diluées de 10 en 10) permet d'établir une droite d'étalonnage reliant mathématiquement le CT de sortie avec le Log de la concentration des solutions. Lors de la quantification des échantillons, le CT mesuré est reporté sur cette droite d'étalonnage qui permet alors de déterminer la concentration de la solution d'intérêt. Les gammes peuvent être établies par dilution de ADNc issus de matériels biologiques d'intérêt, mais du fait de la faible quantité d'ARN contenus dans l'embryon, nos gammes sont constituées de matériel amplifié à partir des inserts de ADNc clonés dans des plasmides.

Afin de réaliser les gammes il faut connaître la longueur de chaque amplicon présent dans les plasmides (dans notre cas entre M13R et M13F, amorces universelles présentes dans tous les clones) et connaître le nombre de molécules présentes dans la solution initiale. Le calcul du nombre de molécules d'amplifiat dans une solution se fait par la formule : nombre de molécule =  $(\text{Concentration} * N) / (\text{Taille de l'insert} * 10^{09})$  où N est le nombre d'Avogadro,  $N = 6,023 \cdot 10^{23}$  et la concentration donnée par le biophotomètre. En l'occurrence, dans notre cas, la longueur de l'amplicon va de M13R à M13F qui ont été choisis comme zone d'amorce



**Figure 20. Plasmide pGEM-T Easy (Promega).**

Les sites de liaisons M13 sont situés de part et d'autre de la séquence insérée :

pUC/M13 Forward 2959-2975

pUC/M13 Reverse 176-192

Le mix de PCR (Mix Taq TAKARA, TAKARA Bio, St Germain en Laye, France) est composé de (concentration initiale puis pour 1 tube):

H <sub>2</sub> O	34,25µl
Tampon 10X	5µl
M13R (10µM)	1,5µl
M13F (10µM)	1,5µl
DNTP mix (10mM)	4µl
Taq (5U/µl)	0,25µl

Auquel on rajoute 0,5µl de solution diluée de plasmide à 50ng/µl. Puis on réalise une PCR dans les conditions suivantes : 94°C pendant 5 minutes, puis 35 cycles : 94°C 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 minute 30 secondes. On passe ensuite les échantillons 10 minutes à 72°C avant de terminer à 10°C.

pour la PCR. Ainsi il est effectué une série de dilutions d'un facteur 10 à partir de la solution initiale pour laquelle on connaît précisément la quantité de molécules présentes.

Dans notre étude, une fois des gènes candidats mis en évidence par le réseau, nous réalisons une extraction des plasmides à partir des clones qui ont servi à constituer le réseau et qui contiennent les séquences candidates. La concentration du produit de chaque tube est déterminée par la densité optique à 260nm mesurée par un spectrophotomètre. La densité optique est mesurée en unité d'absorbance (UA) et 1 UA correspond à 50µg d'ADN double brin par ml.

Pour chaque plasmide, une PCR est réalisée en utilisant les amorces universelles M13R et M13F. Ces amorces étant présentes dans tous les clones, cela permet d'être sûr de pouvoir amplifier toutes les séquences situées entre ces deux amorces, quelle que soit la séquence (carte du plasmide : Figure 20).

Un microlitre de produit de chaque tube de PCR est alors déposé sur un gel d'agarose à 1,2%, en parallèle avec une gamme de poids moléculaire pour vérification de la qualité de l'amplification et de la taille du fragment mesuré.

Une purification du produit de PCR est ensuite réalisée (QIA quick purification kit, QIAGEN, Courtaboeuf, France).

Une fois les gammes validées, un aliquotage des solutions est effectué. Nous avons ensuite réalisé les expériences sur les échantillons expérimentaux.



### 1.5.5. PCR

Pour l'amplification de l'ARN de l'Adipophiline, les séquences des amorces étaient les suivantes : forward primer (5'-AGA TGG CAG AGA AGG GTG TGA AG-3') et reverse primer (5'-CCC CTG TGA TTG TGT TGG CTA C-3').

Le mix de PCR était composé, par tube, de 12,5µl de Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,25%l de UNG à 1U/µl, 1,75µl d'H<sub>2</sub>O, et 0,25µl de chaque primer à 100nM. Le programme de PCR commence par 2 minutes à 50°C pour l'action de l'UNG puis 95°C pendant 10 minutes pour dénaturation des ADN et activation de la Taq. Il y a ensuite 45 cycles comprenant une phase de 15 secondes à 95°C pour dénaturation et 1 minute à 60°C pour hybridation des primers et élongation. Il y a ensuite l'établissement de la courbe de fusion ; la machine descend aux environs de 65°C et remonte progressivement jusqu'à 94°C : la fluorescence est mesurée tous les 0,8°C. La température redescend alors à 20°C. La machine utilisée est une ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystem, Pleasanton, Ca).

L'analyse du réseau dédié laissait suggérer une différence d'expression d'un facteur 1,5 entre les embryons issus de mères HH et les C. Pour connaître le nombre d'échantillons nécessaire pour montrer que la différence entre deux lots est significative, nous avons utilisé la formule de Calcul d'Effectif utilisé en épidémiologie pour la mise en place d'effets cliniques. Cette formule qui permet, avec une puissance de 80% de mettre en évidence une différence ( $\delta$ ) entre deux conditions avec une variance ( $\sigma^2$ ) est  $n=(2\sigma^2/\delta^2)\times 7,85$ . Pour obtenir les éléments nécessaires à cette formule, nous avons réalisé une PCR quantitative en utilisant 4 tubes contenant une quantité d'ARN N et N/1,5. Pour cela, nous avons extrait l'ARN de pools de 4 lots 10 embryons (Kit Picopure). Nous avons quantifié le produit d'extraction par analyse au biophotomètre et calculé le rendement d'extraction comme décrit précédemment.



Nous avons alors conduit une RT-PCR quantitative sur 4 tubes contenant une quantité N d'ARN (761ng) et 4 tubes contenant une quantité N/1,5 (507ng). Chaque échantillon étant analysé en triplicate. La gamme Adipophiline utilisée a permis d'obtenir l'équation  $y = -3,5786x + 38,568$  avec  $R^2 = 0,998$ . Le résultat de la quantification de ces échantillons nous donne le nombre de copies d'adipophiline initial :  $N=17325 \pm 4300$ . Le nombre de copie dans les tubes N/1,5= $13115 \pm 3100$ . La différence entre les deux séries d'échantillons n'est pas significative ( $p>0.05$ ). La série d'échantillons N a permis de calculer la variance  $\sigma^2$  ( $\sigma^2$  : écart type au carré= $4300^2$ ). La différence  $\delta$  souhaitée par rapport aux échantillons est  $\delta = N - (N/1,5)$  soit  $\delta = 17325 - (17325/1,5) = 5775$ .

L'effectif nécessaire minimum est donc  $n = (2\sigma^2/\delta^2) \times 7,85 = (2 \times 4300^2) \times 7,85 / (5775)^2 = 8,7$ . Il faut donc au minimum 9 échantillons de chaque condition expérimentale pour montrer une différence d'un facteur 1,5. L'expérience portera donc sur 10 lots de 10 embryons issus de mère HH versus 10 lots de 10 embryons issus de mère C. Chaque groupe d'embryons analysé provenait d'au moins 6 lapines différentes. La méthodologie de la collecte d'embryons a été décrite plus haut (« Protocole de super ovulation et collecte d'embryons »).



## **2. Etude Immuno histologique des embryons**

L'objectif était de visualiser la localisation de la protéine Adipophiline au sein des cellules à différents stades du développement et d'évaluer la co-localisation avec d'éventuelles gouttelettes lipidiques.

Un total de 6 femelles ayant le protocole experimental 1 (Régime HH vs C depuis l'âge de 10 semaines) ont reçu le protocole de super ovulation précédemment décrit avant mise à la reproduction à 18 semaines pour un recueil des embryons par flushing des ovidutes à J2 (2 lapines HH et 1 lapine C) et à J5 (2 lapines HH et 1 lapine C).

Tous les embryons ont été manipulés de la même façon : ils ont d'abord été traités avec de la pronase diluée à 5% à 37°C (Pronase P5147, Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. Lyon, France) afin d'éliminer la zone pellucide et le manteau muqueux, puis ils ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 2% pendant 30 minutes, puis rincés dans le PBS (15 minutes à température ambiante). Les embryons ont été ensuite perméabilisés dans le Triton 100X à 0,5% pendant 30 minutes à température ambiante. La saturation des sites non spécifiques a alors été effectuée en PBS/BSA 2% pendant 1h. On a alors réalisé une incubation à 4°C pendant une nuit avec l'anticorps primaire (Adipophilin guinea pig polyclonal antibody, référence GP40, PROGEN Biotechnik, Heidelberg, Allemagne) au 1/100 dilué dans du PBS/BSA 2%.

Après rinçage en PBS (deux fois 10 minutes) à température ambiante, l'incubation avec l'anticorps secondaire marqué Cy5 dilué dans du PBS-BSA 2% au 1/200 a été réalisée pendant 1 heure à température ambiante (IgG anti guinea pig (anti F(ab')<sub>2</sub>), Ref: 706-176-148, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Angleterre). Cette étape est suivie d'un rinçage dans le PBS (2 fois 15 minutes à température ambiante), d'une coloration au Nile Red dilué

Nile Red : Fluochrome qui émet dans le rouge lorsqu'il s'insère dans une membrane phospholipidique. L'absorption se fait à 450-500 nm et l'émission à 553 nm (rouge).

Cy5 : Marqueur fluorescent soluble dans l'eau de la famille des cyanines. La Cy5 est excitée au maximum à 649 nm et émet au maximum à 670 nm (rouge lointain).

DAPI : la 4',6'-diamidino-2-phénylindole est une molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN. Quand le DAPI absorbe la lumière UV elle émet une fluorescence bleue brillante. L'absorption se fait à 358 nm et l'émission à 461 nm (bleu).

au 1/500 dans le PBS (le Nile Red est un marqueur des membranes phospholipidiques, fourni par Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. Lyon, France) (30 minutes à température ambiante) et d'un nouveau rinçage dans le PBS (2\*5 minutes à température ambiante).

Le marquage de l'ADN a été effectué au DAPI à la concentration de 1µg/ml grâce à une incubation pendant 30 minutes à température ambiante, suivi d'un nouveau rinçage (2 fois 15 minutes à température ambiante). Enfin, on a réalisé une post-fixation au PFA 2% pendant 15 minutes à température ambiante afin de mieux conserver le marquage des échantillons jusqu'à l'observation. Les embryons ont été alors rincés dans le PBS à température ambiante et montés entre lame et lamelle avec du citifluor (milieu de montage pour immunofluorescence) (Biovalley, Marne la vallée, France) pour observation.

Dans toutes les expériences, il a été préalablement vérifié qu'aucune réaction croisée n'a eu lieu entre les différents marqueurs utilisés (anticorps secondaire anti-guinea pig, DAPI, Nile Red). Ils ont été testés seul puis simultanément afin de vérifier qu'ils ne marquent pas systématiquement les mêmes structures, mais uniquement lorsqu'il y a co-localisation.

Ensuite, les échantillons ont été observés avec un microscope inversé Axio Observer Z1 (Zeiss) équipé d'un système d'illumination structuré (Apotome) et d'un objectif Plan Achromate 63X (Ouverture numérique=1,4). Temps d'acquisition : DAPI 10ms, Adipophiline 400ms, Nile Red 120ms.



### **3. Résultats de l'expérience 1 (Article) : le régime hyperlipidique hypercholestérolémique donné à des lapine avant la conception affecte l'expression de gènes chez l'embryon, induit un retard de croissance et augmente la susceptibilité des descendants à l'obésité.**

Tous ces résultats sont détaillés dans l'article présenté in extenso ci dessous.

#### **3.1. Résumé des résultats**

Toutes les femelles ont eu une croissance similaire entre la mise sous régime et la mise bas. Elles présentent une hypertriglycéridémie, une hypercholestérolémie et une résistance à l'insuline. L'analyse transcriptomique a mis en évidence une surexpression de l'ARNm de l'Adipophiline au stade de l'activation transcriptomique du génome embryonnaire, ce qui a été confirmé par qRT-PCR. Pendant la gestation, un retard de croissance a été observé dès J9 à l'échographie. Lors de l'euthanasie réalisée à J28 de gestation de 4 lapines HH et 2 lapines C, la tailles des portées n'était pas différente entre les deux groupes. Les fœtus des lapines HH étaient plus légers que ceux des lapines C ( $P < 0,001$ ). Le poids des placentas et des différents organes n'étaient pas significativement différents. Par contre, le ratio poids fœtal/poids du placenta était significativement plus petit au sein du groupe HH ( $5,06 \pm 0,20$  vs.  $5,9 \pm 0,24$ ,  $P < 0,01$ ). Le poids de naissance et l'adiposité était diminuée de façon significative dans le groupe HH vs C ( $p < 0,05$ ). Au moment du sevrage, il n'y avait plus de différence de poids entre les différents groupes alors qu'après, malgré une alimentation normale, les lapereaux HH-HH et HH-C sont devenus plus lourds que les lapereaux C-C et C-HH ( $p < 0,0001$ ). A l'âge adulte les lapins issus de mère HH avaient une tension artérielle plus élevée que les C-C. Après mise sous régime HH pendant 3 semaines le groupe C-C avait une augmentation de la tension artérielle significative, contrairement au groupe HH-HH, et il n'y avait plus de différence entre HH-HH et C-C.



## 3.2. Article 1.

**Article: « Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity »**



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Theriogenology xx (2010) xxx

Theriogenology

[www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

# Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity

O. Picone<sup>a,b</sup>, P. Laigre<sup>c</sup>, L. Fortun-Lamothe<sup>d,e,f</sup>, C. Archilla<sup>a</sup>, N. Peynot<sup>a</sup>, A.A. Ponter<sup>g</sup>, V. Berthelot<sup>h</sup>, A.-G. Cordier<sup>a,b</sup>, V. Duranthon<sup>a</sup>, P. Chavatte-Palmer<sup>a,i,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR 1198 Biologie du développement et reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France

<sup>b</sup> Univ Paris-SUD, Clamart, F-92141; AP-HP, Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital Antoine Béchère, Clamart, F-92141

<sup>c</sup> UE331, Domaine de Bressonvilliers, 91630 Leudeville, France

<sup>d</sup> INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>e</sup> Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>f</sup> ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

<sup>g</sup> ENVA, UMR 1198 Biologie du développement et reproduction, F-94704 Maisons-Alfort, France

<sup>h</sup> AgroParisTech, UMR 791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, F-75231 Paris cedex 05, France

<sup>i</sup> Fondation PremUp, 4 av. de l'Observatoire, F-75006 Paris, France

Received 6 June 2010; received in revised form 20 August 2010; accepted 20 August 2010

## Abstract

Maternal hypercholesterolemia has been shown to lead to fetal intra-uterine growth retardation (IUGR) in rabbits. The effects of a long term maternal hyperlipidemic and hypercholesterolemic diet on embryo, fetal and post-natal development, have not been addressed so far.

Rabbit does were fed either a hypercholesterolemic (0.2%) hyperlipidic (8%) (HH) or a control (C) diet from 10 weeks of age. Sixteen does (N = 8 HH and N = 8 C) were euthanized at 18 weeks to assess the effect of the diet on dams before mating. Embryos from 18 females (N = 9 HH and N = 9 C) were collected from the oviducts at the 16–20 cell stage (embryonic genome activation stage) for gene expression analysis (micro array and quantitative RT-PCR). Thirty females (N = 16 HH and N = 14 C) were mated naturally and fetal growth was monitored by ultrasound. Six of them (N = 4 HH and N = 2 C) were euthanized at D28 of gestation to collect fetuses and placentas. Finally, the remaining 24 does delivered at term and litters were cross fostered and equilibrated in number to create 4 groups according to the biological dam and the foster dam (C-C, C-HH, HH-C, HH-HH). Growth was monitored until weaning. A subset of 26 offspring from the 4 groups was fed the control diet until 25 weeks of age and then fed the HH diet for three weeks.

All does had similar growth rates and bodyweight. Transcriptomic analyses evidenced an overexpression of Adipophilin in HH embryos at the stage of embryonic genome activation. This was confirmed by quantitative RT-PCR. During pregnancy, IUGR was observed from D9 by ultrasound and subsequently, fetal weight at 28 days, birthweight and fat deposition in newborn offspring were significantly decreased in HH (P < 0.05). After weaning, there was no significant difference for weight between HH-HH and HH-C offspring and both groups became significantly heavier (P < 0.0001) than C-C and C-HH offspring. During the 3 weeks when offspring were fed the HH diet, the differences in feed intake were no longer significant between groups but the differences

\* Corresponding author; Tel.: +33 1 34 65 25 58; fax: +33 1 34 65 23 64.  
E-mail address: [pascale.chavatte@jouy.inra.fr](mailto:pascale.chavatte@jouy.inra.fr) (P. Chavatte-Palmer).

in body weight remained. At post-mortem, offspring from HH does had significantly more abdominal and inter-scapular fat than offspring from C does ( $P < 0.05$ ).

These data illustrate the importance of maternal nutrition before and during gestation in the establishment and control of the growth trajectory of the conceptus and in the onset of disease in adult life.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Rabbit; Lipids; Programming; Embryo

## 1. Introduction

Epidemiological studies in humans have demonstrated that the incidence of metabolic diseases in adults such as hypertension, insulin resistance and the metabolic syndrome is markedly increased when maternal nutrition is altered at critical periods of fetal or even embryonic development [1]. This phenomenon, which can severely affect human health, is referred to as metabolic programming. Rodents (mice and rat) and also ruminants (sheep) are used as animal models to analyze the underlying molecular mechanisms where the long lasting effects of perturbations brought to the environment of early developing organisms are suspected to induce a "predictive adaptive response" of genes that control the genetic program of development [2]. The focus has mainly been on maternal nutritional restriction related to the intra uterine growth retardation (IUGR), of marked concern in neonatology. Excess fat intake has also become, however, an important matter of health concern in most western countries where the average diet includes now more than 32% of calories derived from fat, with a high proportion of saturated fats [3]. The influence of excess dietary fatty acids during pregnancy on children's health remains largely unknown [4].

Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer in humans have been reviewed [5]. During pregnancy in humans, the fetus is largely dependent on maternal supply for its lipid needs (especially long chain N-3 and N-6 fatty acids) and fetal lipogenesis is negligible. The increase in maternal weight in the first two trimesters is essentially due to adipose tissue growth. Lipolytic activity increases in the adipose tissue in the case of food restriction, resulting in the mobilization of fatty acids and glycerol which are metabolized in the liver to ketone bodies and glucose which easily cross the placenta. In the last third of pregnancy, lipolysis increases in response to increased fetal needs (the human fetus stores more than 90% of its term lipids within the last 10 weeks of pregnancy) [6,7]. Triglycerides are either transferred to plasma lipoproteins or a small proportion can be catabolized to free

fatty acids. Finally, cholesterol can be transferred to the fetus through the placenta but the efficacy of this transfer appears to depend on gestational age [5,8].

Rodents are often used as models to evaluate the effect of excess lipids in the maternal diet [3]. Indeed, the placentae of rodents, lagomorphs and primates are relatively permeable to fatty acids compared to that of other species since free fatty acids and ketoacids can be readily transferred from the maternal compartment to the fetus(es). In rats, a high saturated fat diet administered to the dam just prior to breeding (10 days) and during pregnancy has been reported to alter aortic fatty acid composition and decrease small artery relaxation in response to acetylcholine in offspring fed regular chow [9], with females being more severely affected than males [10]. It has also been shown in Virgin Wistar Rats that a maternal high fat diet administered from the age of weaning or only during pregnancy and lactation to dams can induce a markedly obese phenotype in male and female offspring, independent of post-natal nutrition [11].

The rabbit was classically used in the past as an experimental animal model of atherosclerosis and cardiomyopathy [12]. It has received a new interest in the study of the long lasting effects of a hypercholesterolemic diet and the prevention of atherosclerosis [13–15]. This is because the lipid metabolism in this species is closer to that of humans (high circulating LDL) than the other aforementioned species. Moreover, lagomorphs, to which the rabbit belongs, possess a hemochorial placental structure which is more similar to that of humans than the placenta of rodents (and even more so than the pig and the sheep). This is a decisive advantage when the scientific hypothesis to be tested is related to placental nutrient transport and feto-maternal exchanges [16,17]. The biology and physiology of this species have been characterized in detail since its use as a pioneer model at the emergence of mammalian experimental embryology at the turn of the 20th century [18].

In rabbits, a maternal hypercholesterolemic diet (0.2%, with no excess in lipids), given from 7 days

Table 1  
Ingredients and chemical composition of Control (C) and Hypercholesterolemic Hyperlipidic (HH) diets.

	C	HH
Ingredients (g per 1000 g)		
Wheat	140.00	131.31
Barley	160.00	150.07
Bran	110.00	103.18
Alfalfa	140.00	131.31
Sunflower	165.00	154.76
Soybean meal	95.00	89.11
Beet pulp	124.00	116.31
Straw	35.00	32.83
Dicalcium Phosphate	10.00	9.38
Salt	5.00	4.69
CMV	15.00	14.07
Lysine	0.50	0.47
Methionine	0.50	0.47
Soybean oil		60.03
Cholesterol		2.01
Chemical composition		
Digestible Energy (MJ/kg)	11.53	9.94
Crude protein (%)	18.08	16.96
Fat (%)	2.03	8.05
Crude fiber (%)	14.20	13.32
Starch (%)	19.43	18.22
Ca (g/kg)	8.02	7.52
P (g/kg)	6.67	6.26
K (g/kg)	9.99	9.37
ADF (%)	16.53	15.51
NDF (%)	29.70	27.86
Lignin (%)	3.57	3.35
Methionine (g/kg)	3.59	3.37
Methionine+cystine (g/kg)	8.79	6.37
Lysine (g/kg)	8.55	8.02

prior to mating to term, induces IUGR at term ( $-15\%$  of body weight) [16], in association with a decrease in cholesterol synthesis in the maternal and fetal liver somehow compensated for by an increase in synthetic activity in the placenta [19]. The aim of this work was to evaluate the effects of a maternal hyperlipidic hypercholesterolemic diet administered for a long time (from the prepubertal period) at different developmental stages, i.e., embryo, fetus, newborn, weaning and adult using a rabbit model.

## 2. Materials and methods

The experiment was performed in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals as promulgated by the Society for the Study of Reproduction and in accordance with the European Convention on Animal experimentation. Researchers involved in the work with the ani-

mals possessed an animal experimentation license delivered by the French veterinary services. The slaughter of the animals was performed at the local experimental slaughterhouse according to the protocol approved by the local ethics committee (Southern Parisian Regional Ethics Committee) and the veterinary services. The whole experiment was approved by the local scientific committee for animal use.

### 2.1. Diet

The high cholesterol high fat diet (HH diet) was aimed at inducing hyperlipidemia, hypercholesterolemia and atherosclerosis without inducing abortion in the does. As it was not possible to monitor cholesterol plasma levels on a regular basis in order to adjust cholesterol concentrations in the diet, a 0.2% cholesterol, 8% fat diet was used ( $N6/N3 = 6.86$ ), close to what was described previously by others [15]. Preliminary experiments with this diet had indicated that it was compatible with neonatal viability in contrast to what had been shown in one early study [20]. All diets were in the form of pellets. They were prepared in the experimental unit of Castanet-Tolosan. Soybean oil (Sigma) and cholesterol (Sigma) were used as fat and cholesterol sources for the HH diet. The rest of the diet was strictly identical, so that the HH diet also provided 16% more energy than the control diet (Table 1).

### 2.2. Animals

The experimental protocol is detailed in Figure 1. Altogether, 64 New-Zealand does of INRA 1007 line were used. They were housed individually in the same building with a temperature and light controlled envi-

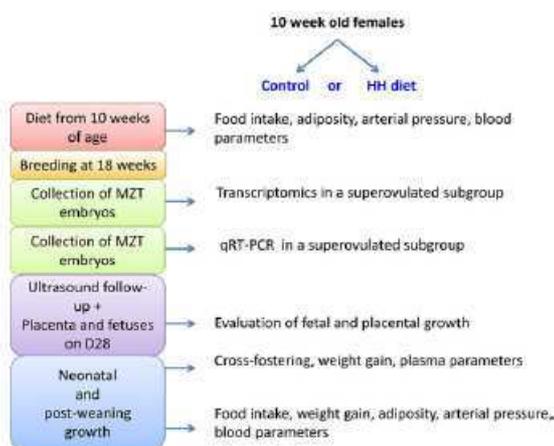


Fig. 1. Experimental Protocol for Experiments 1 and 2.

ronment. All does were fed either a hypercholesterolemic (0.2%) hyperlipidic (8%) (HH) or a control diet (C) from 10 weeks of age. Diets were delivered *ad libitum*, and food intake and bodyweight were monitored weekly. The light regimen was changed from 8 to 16 h per day, a week before breeding, and this was maintained until weaning. New-Zealand, INRA 1007 line males were used for mating. Weaned offspring were transferred to an 8 h light per day environment and housed individually.

The 64 does were used for different experiments as detailed below:

—Sixteen virgin females (N = 8 HH and N = 8 C) were euthanized at 18 weeks to assess the effect of the diet.

—Eighteen females (N = 9 HH and N = 9 C) were superovulated by 5 subcutaneous administrations of pFSH (Stimufol®, Merial, Lyon) for 3 days before mating: twice 5 µg on Day 1 at 12 h intervals, twice 10 µg on Day 2 at 12 h intervals, and once 5 µg on Day 3, followed 12 h later by an iv administration of 30 IU HCG (Chorulon, Intervet) at mating time (natural mating). Embryos at the 16–20 cell stage (embryonic genome activation stage) were recovered from oviducts flushed with PBS at 48h post coitum, immediately after euthanasia. Embryos were carefully selected according to their stage and morphology by experienced embryologists to obtain homogenous groups of only “normal” (at the right developmental step for the time) 16–20 cell stage embryos without cell fragmentation, or cell exclusion, and with regular sized cells were used for molecular biology analyses (group A embryos). Retarded embryos (group B) were discarded. For transcriptomic analyses, each sample corresponded to 20 group A embryos from one individual HH or control female. For qRT-PCR analyses, group A embryos from at least six different HH or control females were pooled in batches of 10 embryos and subsequently dry frozen and stored at –80 °C until use. Donor females for transcriptomic and qRT-PCR experiments were distinct, they were fed with the diets at different periods of time.

—Thirty females (N = 16 HH and N = 14 C) were mated naturally at 18 weeks of age. Fetal growth was monitored by ultrasound. Six of them (4 HH and 2 CC) were euthanized at 28 days of pregnancy (22 weeks of age) to collect fetuses and placentas.

The remaining 24 does delivered naturally and litters were cross fostered at birth and equilibrated to reach 6 pups per doe, forming 4 sub groups:

—offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the HH diet (HH-HH);

—offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the C diet (HH-C);

—offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the HH diet (C-HH);

—offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the C diet (C-C).

Sex was not taken into consideration for cross-fostering as offspring were sexed only at weaning. Neonatal growth was monitored and animals (dams and offspring) were euthanized at weaning (one month). A subset of offspring from the 4 groups (“post-weaning” group, n = 26) were kept for long term monitoring. They were fed control chow until 176 days of age (5 months) and subsequently the HH diet for 3 weeks prior to euthanasia at 196 days. Weight, food intake and blood pressure were monitored weekly in these last 3 weeks.

### 2.3. Blood sampling

Blood samples were drawn in the morning from animals fasted overnight. Blood was obtained from the peripheral ear vein after gently rubbing the ear with wintergreen oil in order to induce some vasodilatation. In does, samples were obtained at the beginning of the experiment (10 weeks old), one week prior to breeding (16 weeks of age) and at mid-gestation. Blood was drawn from offspring at euthanasia (weaning) or at 4 months of age for the “Post-weaning group” and subsequently at euthanasia 3 weeks later. All samples were collected in 5 ml EDTA coated vacutainers. Samples were centrifuged within an hour of collection and supernatant stored in several aliquots at –20 °C until analysis.

### 2.4. Mean arterial pressure

Blood pressure was measured in the ear artery in non-anaesthetized does and Post-Weaning offspring using previously described methods [21]. Briefly, rabbits were placed in a plexiglas custom-made cage where the ears were accessible for the operator. The ear was surgically prepared and a small ear artery catheter inserted. Mean arterial pressure (MAP) was measured by connecting the ear artery catheter to a pressure transducer placed at the level of the rabbit’s heart (Biopack systems, Goleta, USA) and recorded using specific software (AcqKnowledge, Biopack systems, Goleta, USA) after the pressure had stabilised.

### 2.5. Micro-array analysis of embryos

Target amplification, labeling and microarray hybridization were performed as described by Leandri et

al [22]. Briefly, total RNA was extracted from 4 independent pools of 20 embryos from each diet. Each RNA sample was subsequently amplified and labeled by two independent procedures (global RT-PCR or aRNA in vitro transcription). The 16 resulting hybridization targets (4 pools or biological repetitions, 2 dietary conditions, 2 amplification methods) were hybridized to our rabbit embryo dedicated array [22]. After quantification, hybridization signals were log-transformed and normalized before data analysis. Differential analysis was performed by ANOVA with Genanova software [23]. For each array probe, the equation used was the following:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + M_j + R_k + \varepsilon_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  is the array probe intensity and  $\mu$  the mean of intensities of expression measured for the probe.  $D_i$ ,  $M_j$ , and  $R_k$ , are respectively, the effects of the analyzed Diet  $i$ , the amplification Method  $j$ , and the biological Repetition  $k$ .  $\varepsilon_{ijk}$  is the residual error including all interactions between these factors.

### 2.5. Real time quantitative RT-PCR

RNA extraction, recovery rate estimation, cDNA synthesis, PCR amplification, and data normalization by exogenous luciferase reporter RNA quantification were performed as described previously [24]. The use of a carrier RNA (16S-28S carrier Roche diagnostic) makes it easy to estimate the recovery rate after RNA extraction and to equalize the amount of starting material involved in the cDNA synthesis step. Results were normalized using an exogenous luciferase transcript to avoid any diet effect on the reporter. For Adipophilin, primer sequences were as follows: forward primer (5'-AGA TGG CAG AGA AGG GTG TGA AG-3') and reverse primer (5'-CCC CTG TGA TTG TGT TGG CTA C-3'). The number ( $n$ ) of samples needed to evidence a difference ( $\delta$ ) between two conditions with a variance ( $\sigma$ ) was determined as  $n = (2\sigma^2/\delta^2) \times 7.85$  when a 80% power is required.

### 2.6. Fetal monitoring

Fetal and placental growth were monitored by ultrasound on Day 9, 14, 21 and 28 of pregnancy as described elsewhere [25]. The abdomen was clipped prior to the first examination and when needed on subsequent examinations. The does were laid down on their backs in a custom-made case. Using a Philips HDI 5000 ultrasound (Philips, Best, The Netherlands) equipped with a 5 to 7.5 MHz probe, the urinary bladder was located and the two fetuses closest to the bladder were

measured in each horn (each side). Measurements included fetal sack length and width (D9 and D14), fetal length and width (D14), placental length and width (D14 to D21), abdominal perimeter, head length and width, biparietal diameter and heart rate (D14 to D21) and kidney length and width (D28). Due to the rapid fetal growth, it was not possible to follow one single measurement throughout pregnancy.

### 2.7. Post-natal monitoring

Does gave birth naturally and the date of birth was recorded. They were left alone with the pups for the first 24 h. Pups were weighed the next day and identified using ear labels (Boucles Simplex baby, Chevillot, Albi, France). They were weighed each week until weaning. After weaning, animals were housed individually so as to monitor food intake.

### 2.8. Post-mortem examinations

At post-mortem, liver, kidneys, interscapular and perirenal fat were collected and weighed. The fetal aorta was exposed and the branching arteries were cut off. The aorta was slit open, thoroughly washed with cold sterile PBS to remove adherent blood cells. After dissection of excess fat, they were fixed in 1% formaldehyde for 24 h at 4 °C. All aorta were secondary stained with oil red O for 1 h and washed with ethanol (70%) for 20 min to visualize atherosclerotic lesions as described elsewhere [26].

### 2.9. Assays

Total cholesterol, HDL and triglycerides were measured with an enzyme immunoassay (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) previously validated in the rabbit plasma [27]. Non-esterified fatty acids (NEFA), glucose and urea concentrations were determined using an Autoanalyser (Chemical Profile Analyser CPA, Coultronics, Margency, France) with kits (NEFA C, Wako, Chemical GmbH, Neuss, Germany; Glucose quant, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany; Urea Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) on rabbit plasma.

### 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of longitudinal data was performed using SAS software using a PROC Mixed model for repeated analyses [28], with dam, foster dam and time of experiment (serial experiments) as cofactors. This analysis provides an overall statistical analysis together with the analysis of individual time points. ANOVA, student  $t$  or Mann-Whitney tests were used for the analysis of post-mortem data using XLStat 2008 software. Statistical anal-

ysis of qRT-PCR results was performed by Student t-test.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant. All results are expressed as means  $\pm$  SEM.

### 3. Results

#### 3.1. The HH diet administered from before puberty induces high adiposity and dyslipidemia but not obesity in dams at 18 weeks

Weight gain was not significantly different between HH and C dams although the mean weekly energy intake during the 10–17 week period was higher in HH compared to C does ( $11.84 \pm 0.34$  vs.  $10.88 \pm 0.39$  MJ, respectively, +8.8% energy,  $P < 0.05$ ). Mean weekly lipid intake was significantly higher for HH does compared to C does (total of lipid intake from 10 weeks to delivery:  $878 \pm 4.74$  g vs.  $250.25 \pm 8.27$  g,  $P < 0.001$ ) and subsequently blood lipid parameters were increased. Body and organs (kidneys, liver, fat) weights were not statistically different at 18 weeks (mating age). Blood plasma parameters are described in Table 2. At 18 weeks, lipid metabolite concentrations were significantly higher in the HH group compared to C controls ( $P < 0.05$ ). Aortic atherosclerotic lesions were observed in all HH does at post-mortem, mainly localized in the aortic arch and covering  $7.79 \pm 1.74\%$  of the aortic surface.

#### 3.2. The HH diet administered from before puberty induces abnormal gene expression in 8-16 cells embryos at the maternal to zygotic transition stage (MZT)

Altogether, 346 embryos were recovered from the HH dams and 402 from the controls. Embryos were

sorted according to morphological parameters (see Materials and methods). There were significantly more group A embryos in the C group compared to the HH group ( $321/402$  (79.8%) vs.  $255/346$  (73%),  $P < 0.05$ ). Differential screening of the dedicated microarray with the 16 targets (2 groups, 2 amplification protocols, 4 repetitions) corresponding to 48hPC group A embryos recovered either from HH or from C females evidenced Adipophilin with a significant ( $P < 0.01$ ) diet effect. Adipophilin was found to be overexpressed (ratio about 1.5) in HH embryos. Because this protein is involved in lipid droplet formation and plays a role in lipid storage [29–31], our attention focused on its expression in HH embryos. Quantitative RT-PCR experiments were thus set up using different pools of HH and C embryos recovered from different HH and C females, respectively, to confirm the transcriptomic results. Because both the expression level in control embryos and the difference between HH and control embryos were expected to be low, we first set up a pilot experiment starting from 4 embryonic RNA samples. For each sample, we quantified Adipophilin transcripts from 2.3 and 3.5 equivalent embryos thus mimicking a 1.5 fold difference in transcript quantity. In our qRT-PCR conditions, and taking into account the biological variability between samples, we determined that 9 samples were to be analyzed to evidence a 1.5 fold difference (with a 80% power). Therefore we carried out a quantitative RT-PCR experiment starting from 10 batches of 10 embryos for each dietary condition. As shown in Figure 2, qRT-PCR analysis confirmed that Adipophilin expression was higher in HH than in control embryos ( $P < 0.05$ ). The mean quantity of Adipophilin transcripts was highly variable among

Table 2

Mean  $\pm$  SEM fasting plasma total cholesterol, HDL, triglycerids, insulin and glucose concentrations in dams according to age and diet. C: control does, HH: treated does, ND: not determined.

	Group	Age (weeks)			
		11 Weeks	18 Weeks (pre-breeding)	20 Weeks (mid-gestation)	25 Weeks (weaning)
Total Cholesterol (mol/l)	C	$3.09 \pm 1.77$	$1.65 \pm 0.15$	$3.58 \pm 2.03$	$1.38 \pm 0.14$
	HH	$7.57 \pm 1.43^*$	$17.31 \pm 1.62^*$	$19.26 \pm 2.84^*$	$12.99 \pm 2.82^*$
HDL (mol/l)	C	$0.75 \pm 0.15$	$0.91 \pm 0.09$	$1.04 \pm 0.10$	$0.81 \pm 0.06$
	HH	$1.30 \pm 0.12^*$	$1.30 \pm 0.11^*$	$1.40 \pm 0.13^*$	$1.27 \pm 0.18^*$
Triglycerides (mol/l)	C	$0.30 \pm 0.10$	$0.64 \pm 0.04$	$0.83 \pm 0.27$	$0.55 \pm 0.06$
	HH	$1.08 \pm 0.15^*$	$1.61 \pm 0.34^*$	$1.61 \pm 0.34$	$1.17 \pm 0.30^*$
Glucose (mol/l)	C	$6.19 \pm 0.16$	$6.74 \pm 0.21$	$6.96 \pm 0.30$	$7.02 \pm 0.22$
	HH	$6.52 \pm 0.22$	$6.82 \pm 0.19$	$7.17 \pm 0.45$	$7.45 \pm 0.69$
Insulin (mol/l)	C	$0.22 \pm 0.08$	ND	$0.21 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.06$
	HH	$0.18 \pm 0.03$	ND	$0.46 \pm 0.09^*$	ND

\* Indicates a significant difference between the two groups ( $P < 0.05$ ).

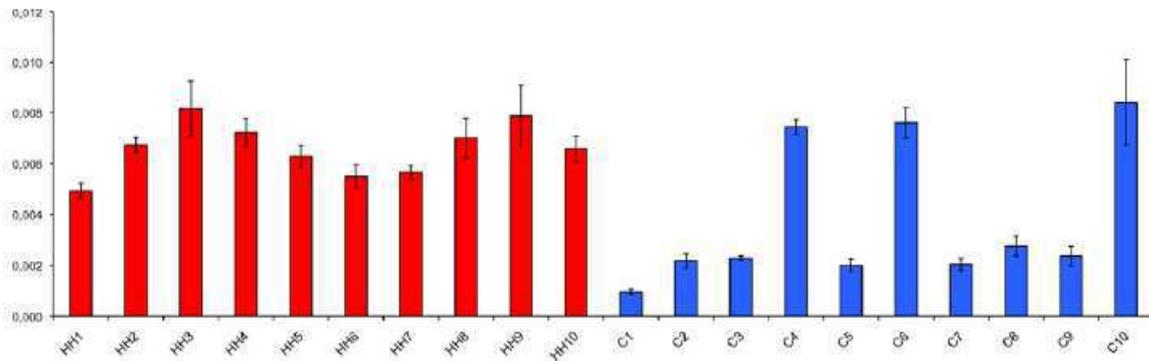


Fig. 2. Quantification of Adipophilin in pools of 10 batches of 10 embryos for the HH group (HH1 to HH10) and C group (C1 to C10) at 48h post coitum. Results are expressed as Adipophilin/luciferase ratio  $\pm$  SEM in each sample.

control samples, with only few samples displaying a higher level of expression. In contrast, HH samples displayed a higher but less variable expression of this gene.

### 3.3. The HH diet administered from before puberty induces IUGR in offspring

#### 3.3.1. Dams

Nine out of 12 versus seven out of 12 does became pregnant in the C and the HH group, respectively. There was no statistical difference between groups for glycemia at any time. Nevertheless, at 20 weeks (mid-gestation) in fasted animals, insulin concentrations were significantly higher in HH fed does compared to C ( $0.46 \pm 0.09$  vs.  $0.21 \pm 0.01$  mol/l;  $P < 0.05$ ) (Table 2). At mid-gestation, total cholesterol and HDL concentrations were significantly higher in HH compared to C does (Total cholesterol:  $19.26 \pm 2.84$  vs.  $3.58 \pm 2.03$  mol/l;  $P < 0.001$  and HDL:  $1.40 \pm 0.13$  vs.  $1.04 \pm 0.10$  mol/l;  $P < 0.05$  respectively), whereas triglyceride concentrations were not statistically different between groups.

#### 3.3.2. Offspring

*In utero* growth was impaired as early as 9 days of gestation with fetal vesicle measurements being significantly decreased in HH does (vesicle perimeter:  $37.9 \pm 0.5$  vs.  $40 \pm 0.4$  mm,  $P < 0.05$ , length:  $12.65 \pm 0.19$  vs.  $13.27 \pm 0.15$ ;  $P < 0.05$  and width:  $11.35 \pm 0.15$  mm vs.  $12.29 \pm 0.14$ ;  $P < 0.001$ ). On D14, fetuses from HH does were significantly shorter than fetuses from C does (fetal length  $10.78 \pm 0.17$  mm vs.  $11.64 \pm 0.18$  mm,  $P < 0.001$ ). However, there were no differences between groups on Day 21. On Day 28, placental length was greater in the HH group ( $17.69 \pm 0.41$  mm vs.  $16.47 \pm 0.9$  mm,  $P < 0.05$ ), but placental width was

smaller ( $9.79 \pm 0.49$  mm vs.  $11.39 \pm 0.75$  mm,  $P < 0.05$ ) compared to the C group. Mean fetal abdominal perimeter, which is considered to be decreased when the fetus is lean, were smaller in the HH compared to the C group ( $10.10 \pm 0.34$  mm vs.  $10.40 \pm 0.44$  mm,  $P < 0.05$ ). There were no statistical differences between groups for cardiac area, fetal heart rate and kidney measurements. At post-mortem examination on D28, mean litter size was  $8 \pm 1$  (range 6–10) in the 4 HH does versus 8 and 9 in the 2 controls. Fetuses from HH females were significantly lighter than controls ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3). There was no significant difference for the placental, liver and kidney weight related to total weight of the fetus. In contrast, the fetus to placenta ratio (F/P) was significantly lower in HH offspring ( $5.06 \pm 0.20$  vs.  $5.9 \pm 0.24$ , respectively,  $P < 0.01$ ).

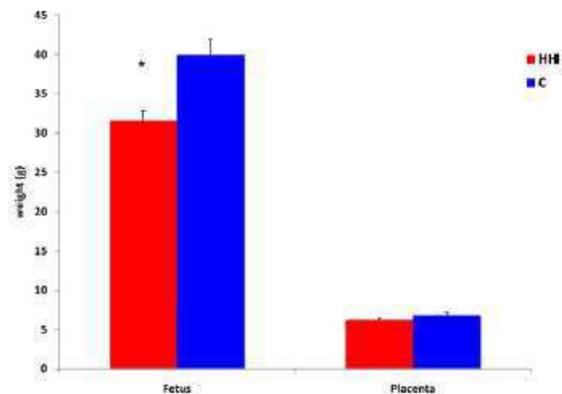


Fig. 3. Mean  $\pm$  SEM fetal and placental weight at 28 days of pregnancy. Fetuses from HH females (N = 32) were significantly lighter from control (N = 17).

Table 3  
Number of offspring born, survival rates and organ weights at birth.

	Group		P value
	C	HH	
Number of pregnant/non pregnant females	9/12	7/12	NS
Mean $\pm$ SEM length of gestation (days)	31.1 $\pm$ 0.32	32.2 $\pm$ 0.53	P < 0.05
Total number of offspring	78	49	
Number of offspring per doe that delivered	8.67 (7–11)	7 (2–9)	NS
Mean $\pm$ SEM birth weight (g)	41.9 $\pm$ 0.76	37.6 $\pm$ 0.91	P < 0.05
Mean offspring measurements at birth			
Perirenal fat /body weight ratio	0.27 $\pm$ 0.04%	0.15 $\pm$ 0.01%	P < 0.05
Kidney/body weight ratio	1.08 $\pm$ 0.09%	1.03 $\pm$ 0.04%	NS
Liver/body weight ratio	7.06 $\pm$ 0.51%	6.45 $\pm$ 0.29%	NS
Survival rate at birth	87.70%	52.30%	NS

### 3.4. Effect of maternal diet during suckling

Birth parameters are described in Table 3. The birth weight of HH pups was significantly reduced compared to C, despite the fact that mean gestation length was longer in the HH group (P < 0.05). The survival rate at birth tended to be lower in the HH but the difference was not significant between groups. Twenty-four offspring of each group were euthanized and autopsied at birth. Perirenal fat (absolute weight and relative to total body weight) was significantly lower in HH pups (P < 0.05). There was no significant difference for kidney nor liver weight (absolute weight and relative to total body weight).

The mean survival rate until weaning was not statistically different between groups. Although HH offspring were lighter at birth, a rapid catch-up growth occurred so that body weights were not significantly different between groups at weaning, whatever the diet of the dam (Fig. 4). There was, however, a wide range of variation in the weights of growing pups from both groups.

Pups were euthanized at weaning. There were no statistical differences for organ weights between groups and no atherosclerotic lesions were found on any of the aortas. As shown in Figure 5, fasting plasma concentrations of glucose were not different between groups, but total cholesterol was significantly higher in C-HH offspring compared to HH-HH offspring. Both C-HH and HH-HH groups had significantly higher total cholesterol concentrations compared to C-C and HH-C (P < 0.05), and there was no significant difference between C-C and HH-C. For HDL, there was no significant difference between groups. For triglycerides, concentrations in the HH-HH group were significantly higher than in HH-C and C-C groups (P < 0.05).

### 3.5. Post-weaning development

Eighteen males (7 C-C, 3 C-HH, 5 HH-C and 3 HH-HH) and 8 females (5 C-C, 1 C-HH, 1 HH-C and 1 HH-HH), all born on the same day, were kept until adulthood. Due to the low number of females, it was not possible to compare sex effects between males and females. Statistical analyses were run on all animals

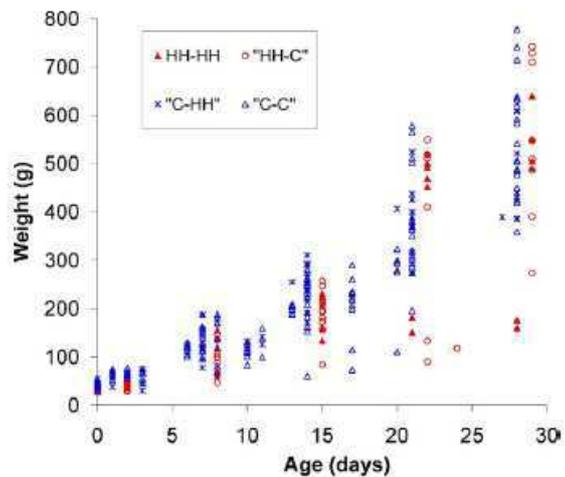


Fig. 4. Individual weight (g) of pups from birth to weaning according to group. Groups are classified as:

- HH-HH: offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the HH diet;
- HH-C: offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the C diet;
- C-HH: offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the HH diet;
- C-C: offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the C diet.

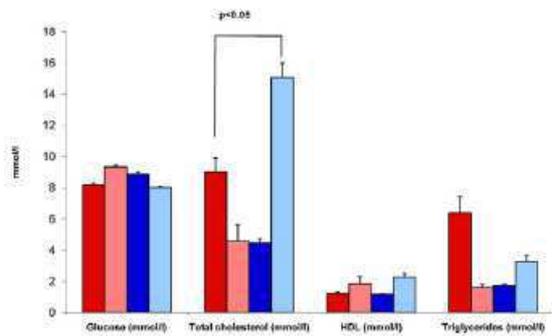


Fig. 5. Comparison of mean  $\pm$ SEM fasting plasma concentrations (Glucose, Total Cholesterol, HDL, Triglycerides) at 1 month of age. Groups are classified as:

HH-HH: offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the HH diet;

HH-C: offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the C diet;

C-HH: offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the HH diet;

C-C: offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the C diet;

and then on males only. Post-weaning growth curves are shown in Figure 6 for the 4 groups.

ANOVA analysis showed a significant effect of the maternal diet, and to a lesser extent, of the suckling

diet. There was no significant difference between the HH-HH and the HH-C groups at any time, but both groups were significantly heavier than C-C and C-HH groups from 3 months of age ( $P < 0.0001$ ). Finally, C-HH were significantly heavier than C-C offspring ( $P < 0.05$ ).

At 176 days of age, HH-HH offspring ate more ( $P < 0.05$ ,  $P = 0.07$  for males only) than all other groups. Altogether, over the period from weaning to the onset of HH diet feeding, offspring born from HH dams (HH-HH and HH-CC) ate significantly more than offspring from C does (C-C and C-HH) ( $P < 0.05$  for the whole group and for males only). During the 3 weeks when offspring were fed the HH diet, the differences in feed intake were no longer significant between groups.

At 176 days of age, systolic blood pressure was significantly increased in HH-HH vs. C-C and not different between the other combinations, nor when males only were considered (Table 4 for C-C and HH-HH). Systolic, diastolic and mean arterial blood pressure significantly increased in C-C, C-HH and HH-C offspring ( $P < 0.01$ ) during the period when the animals were fed the HH diet. In contrast, only MAP was increased in the HH-HH animals ( $P < 0.05$ ). Consequently, there were no longer any statistical differences between groups at the end of the treatment.

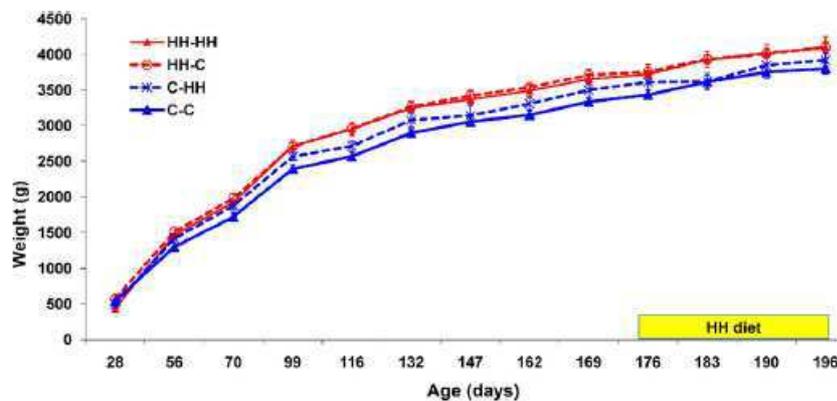


Fig. 6. Offspring growth from birth to D196 (mean  $\pm$ SEM). Groups are classified as:

HH-HH: offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the HH diet;

HH-C: offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the C diet;

C-HH: offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the HH diet;

C-C: offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the C diet.

There was not significant difference between the HH-HH and the HH-C groups at any time, and both groups were significantly heavier than C-C and C-HH groups from 3 months of age ( $P < 0.0001$ ). Finally, C-HH were significantly heavier than C-C offspring ( $P < 0.05$ ).

Table 4

Mean  $\pm$  SEM arterial blood pressure from D171 to D196 in post-weaning CC-CC and HH-HH offspring fed the HH diet between D171 and D196.

Group	Arterial blood pressure	Age (days)	
		171	196
CC-CC	Systolic	134 $\pm$ 2*	151 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
	Mean	107 $\pm$ 2	132 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
	Diastolic	91 $\pm$ 2	117 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
HH-HH	Systolic	146 $\pm$ 12*	166 $\pm$ 7
	Mean	117 $\pm$ 11	136 $\pm$ 5 <sup>a</sup>
	Diastolic	98 $\pm$ 10	120 $\pm$ 3

CC-CC, offspring from dam fed with the C diet suckled by a foster mother fed with the C diet; HH-HH: offspring from dam fed with the HH diet suckled by a foster mother fed with the HH diet.

\* Indicates a significant difference between groups for the same parameter ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> Indicates a significant difference between 171 and 196 days of age ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Indicates a significant difference between 171 and 196 days of age ( $P < 0.01$ ).

Blood biochemistry parameters (glycemia, non-esterified fatty acids and urea) were not significantly different between groups in any combination.

At post-mortem, there were no statistical differences in organ weights between the 4 groups. However, when analyses were run comparing groups according to maternal diet only, liver and kidney/total body weight ratios were lower in offspring from HH dams (HH-C and HH-HH) compared to offspring from C dams (C-C and C-HH) ( $2.3 \pm 0.1\%$  vs.  $2.7 \pm 0.1\%$ ;  $0.40 \pm 0.01\%$  vs.  $0.44 \pm 0.01\%$ ; respectively,  $P < 0.05$ ). Fat mass (perirenal + interscapular fat pads) was significantly higher in offspring from HH dams vs offspring from C dams ( $146 \pm 8$  g vs.  $118 \pm 5$ g;  $P < 0.05$ ). The same was true when only males were considered. No atherosclerotic lesions were observed.

#### 4. Discussion

The originality of our study compared to previous ones on the effect of a hypercholesterolemic hyperlipidic (HH) diet during pregnancy using the rabbit model is that we analyzed the effects of the diet from the very early embryo to the physiological effects in the adult offspring.

In summary, the hyperlipidic hypercholesterolemic diet administered during the preconceptional period and throughout gestation induced atherosclerosis in does and hyperinsulinaemia without changes in glucose levels (indicative of insulin resistance) at mid-pregnancy. Embryonic gene expression was affected as

early as the 8–16 cells stage (especially Adipophilin expression which was confirmed by qRT-PCR) and subsequently fetuses developed IUGR. IUGR newborns that survived caught up before weaning. After weaning, although they were given a control diet, they became overweight, especially due to an increase in fat mass. As adults, their blood pressure was increased, but they did not develop atherosclerosis.

This decrease in insulin sensitivity could have been a mechanism to increase the provision of energy substrate for the fetus by means of higher plasma concentrations of glucose and free fatty acids thus shunting nutrients to the embryo. The normal maternal glucose concentrations indicate that glucose availability was apparently not increased to the fetus through this mechanism. Since the placental glucose transporter SLC2A1 (formerly GLUT1) is not insulin dependent, it is also unlikely that the high maternal insulin concentrations induced an increase in glucose transport to the fetus. Nevertheless, it was recently shown in rabbit does that the placental SLC5A1 (previously SGLT1) protein expression was decreased and that the translocation of SLC2A1 from the cytoplasmic pool to the cell membrane surface was affected by maternal hypercholesterolemia [17].

The transcriptomic data indicate the important role of the pre- and peri-conceptional diet. Cholesterol concentrations were high during the peri-conceptional period which may explain the effects observed on the embryos. Plasma glucose and insulin concentrations, however, were not different between groups just prior to breeding. The qRT-PCR results confirmed the higher expression of Adipophilin in HH embryos than in controls that was expected according to the transcriptomic analysis. However, a highly heterogeneous expression level of Adipophilin was observed in control embryos. Since embryos obtained from at least 6 females were initially pooled before embryos were sampled 10 by 10, it is possible that only a few embryos expressing very high levels of Adipophilin are responsible for such a high variation in control embryos. On the opposite, pools of HH embryos were more similar, which may result either from a higher proportion of “high expressing embryos” or from a less heterogeneous population of embryos all expressing intermediate levels of Adipophilin. Further experiments performed on individual embryos would make it possible to decide between these two possibilities; this however cannot be done at this stage due to the low level of transcripts to be quantified. Contrarily to fetuses analyzed in this study, early embryos used for gene expression analyses were

obtained from superovulated does. We thus cannot formally exclude an effect of superovulation on gene expression. If any, such an effect would however be different according to the diet since both HH and C females were superovulated in our experimental design.

Adipophilin expression has not been previously documented in 8–16 cell stage embryos. Adipophilin usually colocalizes with the surface of neutral lipid droplets in a wide range of cells and tissues that store or synthesize lipids. Lipid droplets are known to be present in early embryos, where they are considered to play important role in energy metabolism during oocyte maturation, fertilization and embryo early development. They also were shown to be sensitive in their size and number to modifications of embryo environment. Especially, the *in vitro* versus *in vivo* environment [32] and the addition of serum to the *in vitro* environment [33] are known to affect lipid droplets. Very interestingly, the analysis of lipid droplets proteome in early drosophila embryos showed their involvement in the sequestration of maternal proteins during the maternal to embryonic transition, until they are needed by the embryo. Among those proteins, maternal histones are sequestered in lipid droplets during oogenesis and progressively transferred to nuclei while development proceeds [34]. Since a conserved functional association of proteins constitutive of lipid droplets has been described between drosophila and mammals [31], it may be hypothesized that modifications in the available amount of adipophilin may impact maternal proteins and especially histone storage and delivery for further development. This may thus indirectly affect some epigenetic process that would result in long term effects on development.

Maternal diet during pre-implantation development acts as a signaling input to the early embryo to regulate its future growth. Disturbances in pre-implantation development have been reported to induce various phenotypes including obesity [35] and hypertension [36] in the offspring. Disrupting the growth of the embryo *in vivo* prior to implantation modifies the cell allocation in the blastocyst [37]. Embryo culture *in vitro* has also been reported to restrict fetal growth and modify placental morphogenesis [35] and nutrient sensing regulatory systems are present in many critical tissues during early development [38]. Watkins et al [39], illustrated the importance of maternal nutrition during early embryo development in the establishment and control of the growth trajectory of the conceptus and in the onset of disease in adult life. The range of adverse outcomes identified following a low protein maternal diet during

the preimplantation period was broad, affecting growth, cardiovascular physiology, behavior and organ allometry. However, to our knowledge, most studies focused on protein restriction or modifications in growth factors. One study, using a hyperlipidic diet in the rat, described the same long term effects as those shown here, but they did not demonstrate different effects when the diet was only administered from the time of breeding and subsequently inferred that pre-conception diet did not have a significant effect. In the present study, growth restriction in offspring from hypercholesterolemic does was observed as early as D9 of gestation, confirming that the peri-implantation period is a key period for the future embryo development. Montoudis et al [16], using does fed a hypercholesterolemic diet, showed that a large increase in serum cholesterol and triglycerides concentrations was induced in the fetuses of hypercholesterolemic does, in association with reduced birth weight and lipid accumulation in the placenta. The reduced fetal to placental ratio observed at 28 days of pregnancy also indicates a reduced placental efficiency.

In IUGR pups, catch-up growth was rapid, with hypotrophic offspring reaching a similar weight as controls at the time of weaning. Rapid post natal growth can be detrimental following growth restriction in animals [40–42] and in humans [43–46]. In the present experiment, body weight and blood pressure differences between groups disappeared when adults were fed the HH diet, suggesting a programmed “protection” (Predictive Adaptive Response, PAR) during the fetal life as proposed by Gluckman and Hanson [2,47]. Overall blood pressure values were high both in controls and treated animals, suggesting that the rabbits were stressed by the procedure. Since there is an element of restraint stress involved in the procedure used to measure MAP in the current study [48], the increase in MAP in the HH-HH group may reflect an increased stress response and not a change in resting MAP.

No atherosclerotic lesions were observed at weaning in the offspring. Atherosclerotic lesions have been seen in young human adults and, occasionally, children. The earliest lesions of atherosclerosis, fatty streaks, are already present in fetal arteries, and maternal hypercholesterolemia during pregnancy greatly increases their number and size [4,49]. Since aortic fatty-streak formation is related to hypercholesterolemia, it seems logical that fetal lesions would regress in infancy, as observed here, when cholesterol concentrations are low [4].

Adult rabbit offspring from dams fed the HH diet were heavier and had higher food intake. It is not possible to know, however, if they were heavier because of increased appetite, or if the metabolically programmed excess weight induced a greater food intake [50].

The data presented here illustrate the importance of maternal nutrition during the preconceptional period and during pregnancy in the establishment and control of the growth trajectory of the conceptus and in the onset of disease in adult life. The results stated in this paper confirm the results from Howie et al [11] in rats and show the harmful effect of a high cholesterol high lipid diet, fed to the mother for a long time prior to conception, on the fetal and post-natal development. They also indicate that maternal nutrition affects embryo gene expression in the very early stages of pregnancy. More studies are mandatory on oocytes and at different stages of embryo development to better understand the mechanisms involved in the observed effects in this rabbit model.

## References

- [1] Barker DJP, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International Journal of Epidemiology* 2002;31:1235–9.
- [2] Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004;305:1733–6.
- [3] Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol (Lond)* 2005; 565:3–8.
- [4] Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 1999;354:1234–41.
- [5] Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006; 65:58–63.
- [6] Haggarty P. Placental Regulation of Fatty Acid Delivery and its Effect on Fetal Growth—A Review. *Placenta* 2002;23:S28–38.
- [7] Hendrickse W, Stammers JP, Hull D. The transfer of free fatty acids across the human placenta. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92.
- [8] Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development - a review. *Placenta* 2002;23:S9–19.
- [9] Ghosh P, Bitsanis D, Ghebremeskel K, Crawford MA, Poston L. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *J Physiol* 2001;533:815–22.
- [10] Khan IY, Taylor PD, Dekou V, Seed PT, Lakasing L, Graham D, Dominiczak AF, Hanson MA, Poston L. Gender-Linked Hypertension in Offspring of Lard-Fed Pregnant Rats. *Hypertension* 2003;41:168–75.
- [11] Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *The Journal of Physiology* 2009;587:905–15.
- [12] Fan J, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol Ther* 2003; 99:261–82.
- [13] Palinski W, D'Armiento FP, Witztum JL, de Nigris F, Casanada F, Condorelli M, Silvestre M, Napoli C. Maternal Hypercholesterolemia and Treatment During Pregnancy Influence the Long-Term Progression of Atherosclerosis in Offspring of Rabbits. *Circ Res* 2001;89:991–6.
- [14] Yamashita T, Freigang S, Eberle C, Pattison J, Gupta S, Napoli C, Palinski W. Maternal immunization programs postnatal immune responses and reduces atherosclerosis in offspring. *Circ Res* 2006;99:E51–64.
- [15] Napoli C, Witztum JL, Calara F, de Nigris F, Palinski W. Maternal Hypercholesterolemia Enhances Atherogenesis in Normocholesterolemic Rabbits, Which Is Inhibited by Antioxidant or Lipid-Lowering Intervention During Pregnancy: An Experimental Model of Atherogenic Mechanisms in Human Fetuses. *Circ Res* 2000;87:946–52.
- [16] Montoudis A, Simoneau L, Brissette L, Forest J-C, Savard R, Lafond J. Impact of a cholesterol enriched diet on maternal and fetal plasma lipids and fetal deposition in pregnant rabbits. *Life Sci* 1999;64:2439–50.
- [17] Kevorkova O, Ethier-Chiasson M, Lafond J. Differential expression of glucose transporters in rabbit placenta: Effect of hypercholesterolemia in dams. *Biol Reprod* 2007;76:487–95.
- [18] Brachet A. Recherches sur le déterminisme héréditaire de l'oeuf des Mammifères. Développement 'in vitro' de jeunes vésicules blastodermiques de Lapin. *Arch Biol (Liège)* 1913;28:447–503.
- [19] Montoudis A, Boileau S, Simoneau L, Lafond J. Impact of an enriched-cholesterol diet on enzymatic cholesterol metabolism during rabbit gestation. *Life Sci* 2003;73:1463–77.
- [20] Zilvermit DG, Remington M, Hughes LB. Fetal growth and placental permeability in rabbits fed cholesterol. *J Nutr* 1972; 102:1681–7.
- [21] Evans, Madden, Denton. Diversity of responses of renal cortical and medullary blood flow to vasoconstrictors in conscious rabbits. *Acta Physiol Scand* 2000;169:297–308.
- [22] Leandri RD, Archilla C, Bui LC, Peynot N, Liu Z, Cabau C, Chastellier A, Renard JP, Duranthon V. Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiol Genomics* 2009;36:98–113.
- [23] Didier G, Brezellec P, Remy E, Henaut A. GeneANOVA - gene expression analysis of variance. *Bioinformatics* 2002;18:490–1.
- [24] Bui LC, Evsikov AV, Khan DR, Archilla C, Peynot N, Henaut A, Le Bourhis D, Vignon X, Renard JP, Duranthon V. Retrotransposon expression as a defining event of genome reprogramming in fertilized and cloned bovine embryos. *Reproduction* 2009;138:289–99.
- [25] Chavatte-Palmer P, Laigre P, Simonoff E, Chesne P, Challah-Jacques M, Renard JP. In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. *Theriogenology* 2008; 69:859–69.
- [26] Zhang C, Zheng H, Yu Q, Yang P, Li Y, Cheng F, Fan J, Liu E. A Practical Method for Quantifying Atherosclerotic Lesions in Rabbits. *J Comp Pathol* 2010;142:122–8.
- [27] Jeon SM, Park YB, Kwon OS, Huh TL, Lee WH, Do KM, Park T, Choi MS. Vitamin E supplementation alters HDL-cholesterol concentration and paraoxonase activity in rabbits fed high-

- cholesterol diet: comparison with probucol. *J Biochem Mol Toxicol* 2005;19:336–46.
- [28] Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci* 1998;76:1216–31.
- [29] Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart JC, Castro G, Rouis M. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:504–10.
- [30] Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem* 1999;274:16825–30.
- [31] Miura S, Gan J-W, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, Oliver B, Kimmel AR. Functional Conservation for Lipid Storage Droplet Association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related Proteins in Mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 2002;277:32253–7.
- [32] Kikuchi K, Ekwali H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H, Rodriguez-Martinez H. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote* 2002;10:355–66.
- [33] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57–66.
- [34] Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA. The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot. *Curr Biol* 2006;16:1783–95.
- [35] Sjoblom C, Roberts CT, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Alleviates Adverse Consequences of Embryo Culture on Fetal Growth Trajectory and Placental Morphogenesis. *Endocrinology* 2005;146:2142–53.
- [36] Kwong W, Wild A, Roberts P, Willis A, Fleming T. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000;127:4195–202.
- [37] Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ. The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004;71:1046–54.
- [38] Maloney CA, Rees WD. Gene-nutrient interactions during foetal development. *Reproduction* 2005;130:401–10.
- [39] Watkins AJ, Ursell E, Panton R, Papenbrock T, Hollis L, Cunningham C, Wilkins A, Perry VH, Sheth B, Kwong WY, Eckert JJ, Wild AE, Hanson MA, Osmond C, Fleming TP. Adaptive Responses by Mouse Early Embryos to Maternal Diet Protect Fetal Growth but Predispose to Adult Onset Disease. *Biol Reprod* 2008;78:299–306.
- [40] Hales CN, Desai M, Ozanne SE, Crowther NJ. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans* 1996;24:341–50.
- [41] Hales NC, Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol* 2003;547:5–10.
- [42] Jennings BJ, Ozanne SE, Dorling MW, Hales CN. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *Febs Lett* 1999;448:4–8.
- [43] Leon DA, Koupilova I, Lithell HO, Berglund L, Mohsen R, Vagero D, Lithell UB, McKeigue PM. Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 year old Swedish men. *Br Med J* 1996;312:401–6.
- [44] Eriksson J, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker D. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *Br Med J* 1999;318:427–31.
- [45] Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 2000;133:176–82.
- [46] Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Br Med J* 2000;320:967–71.
- [47] Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med* 2007;261:461–71.
- [48] O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Prenatal dexamethasone 'programmes' hypotension, but stress-induced hypertension in adult offspring. *J Endocrinol* 2008;196:343–52.
- [49] Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia—Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680–90.
- [50] Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1648–52.

<b>Sur expression au sein des embryons HH vs C</b>	<b>Sous expression au sein des embryons HH vs C</b>	
Adipophiline		Anova p=0,00476
Regucalcine		Anova p=0,00698
	MAPK 7	Anova p=0,00079
PAPOA		Anova p=0,00064 T Test p<0,01
	MGN	Anova p=0,00165 T Test p<0,01
	FGF BP1	Anova p=0,00114 T Test p<0,01

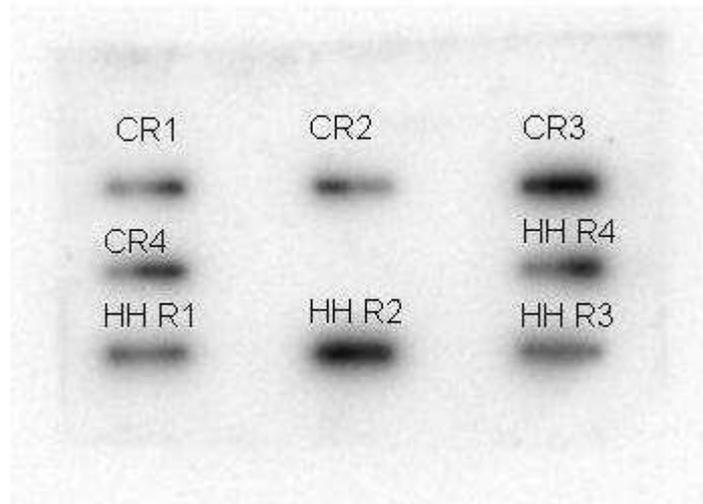
**Tableau 3. Gènes présentant un effet régime significatif d'après l'analyse de variance sur les résultats de transcriptomique.**

### **3.3. Données complémentaires de l'expérience 1.**

L'analyse transcriptomique sur le réseau dédié a permis de mettre en évidence une différence d'expression de plusieurs gènes entre les embryons issus de mères HH et de mère C. Nous avons essayé d'étudier l'expression des 6 gènes pour lesquels la p value était la plus significative: FGF BP1 (Fibroblast Growth Factor Binding Protein de type 1), MGN (Mago Nashi-like protein) et MAPK7 (Mitogen Activated Proteine Kinase 7) avec une tendance à la sous-expression et PAPOA (Poly A Polymerase Alpha), Regucalcine et Adipophiline avec une tendance à la sur-expression par rapport aux embryons issus de mère C (Tableau 3). Cependant les p values étaient à la limite et les rapports d'expression entre le groupes étaient faibles.

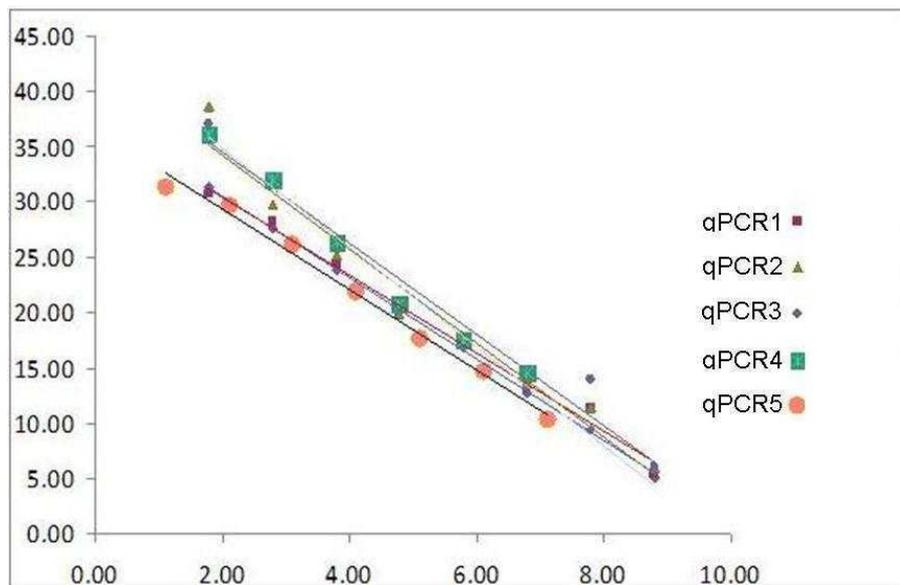






**Photo 8. Résultats du slot blot pour l'adipophiline.**

C : Contrôle, HH : régime hypercholestérolémique hyperlipidique, R : Nombre de Répétition.



	qPCR1	qPCR2	qPCR3	qPCR4	qPCR5
Pente	3,691	3,614	3,76	3,888	4,406
1/pente	0,27093	0,2767	0,266	0,257	0,227
efficacité	0,86608	0,89104	0,8448	0,808	0,6864

**Figure 21. Illustration de l'instabilité d'une gamme au cours du temps. Exemple de MAPK7.**

### 3.3.1. *L'analyse en Slot Blot n'a pas permis de confirmer les résultats du réseau dédié*

La première étape de confirmation de la différence d'expression des gènes a été réalisée par la réalisation d'un SLOT BLOT d'ADNc. Pour l'Adipophiline, il n'y avait pas de différence mise en évidence par cette technique (4 répétitions HH vs 4 répétitions C) ( $p=0,7$ ) (Photo 8). Il s'agit probablement d'un manque de sensibilité de la technique pour prouver de petites différences d'expression. Pour montrer de petites différences, il faut de nombreux échantillons. On peut également remarquer visuellement une variabilité d'intensité des dépôts: CR1 paraît beaucoup moins fort que CR3, et HHR1 moins fort que HHR2. Il n'est pas possible par cette méthode de savoir si les différences sont dues à la variabilité de la méthode ou à la variabilité des échantillons. De ce fait nous n'avons pas analysé les autres gènes par cette méthode et notre choix s'est porté sur la réalisation de RT-PCR quantitatives.

### 3.3.2. *L'analyse par qRT-PCR confirme la sur-expression de l'ARN adipophiline par des embryons J2 issus de mères sous régime HH*

Les gènes candidats comportent de fortes répétitions de nucléotides, rendant aléatoire l'efficacité des amorces avec formation de dimères lors des PCR. De plus, les embryons que nous analysons contiennent de faibles quantités d'ARN (2,5ng par embryon à J2, et 40 à 80ng par embryon à J5). Nous n'avons pas pu réussir à mettre au point des conditions expérimentales permettant de quantifier de façon fiable et reproductible l'expression de la plupart des candidats au sein des embryons à 48h post-coïtum : Regucalcine, MAPK7, Papoa, MGN, FGFBP1. Les gammes doivent être stables au cours du temps pour permettre une bonne reproductibilité des expériences. Or, nous avons constaté l'augmentation de la pente et la diminution de l'efficacité de la qPCR au cours du temps pour plusieurs gènes (Regucalcine,

## Problèmes rencontrés lors de la mise au point des qPCR pour les gènes suivant :

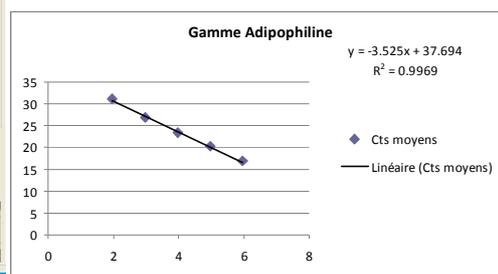
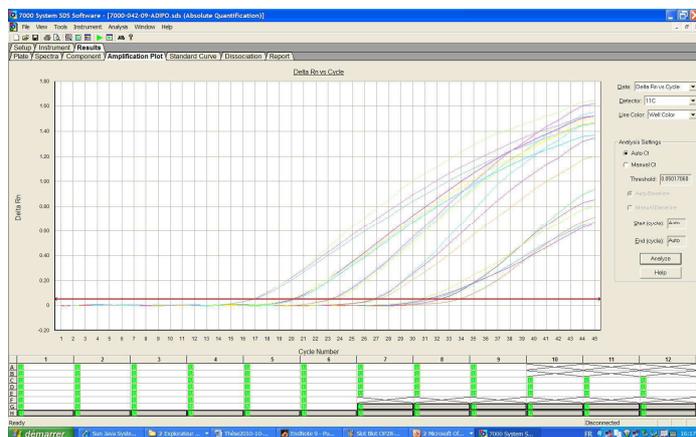
### Regucalcine, MAPK7, Papoa, MGN, FGFBP1.

MGN: Problème de dessin des amorces. Nombreux dimères d'amorce.

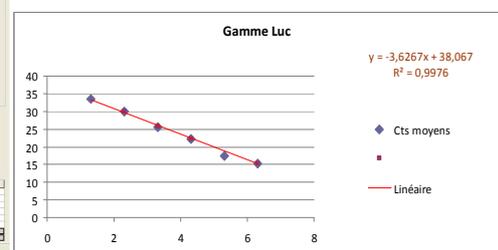
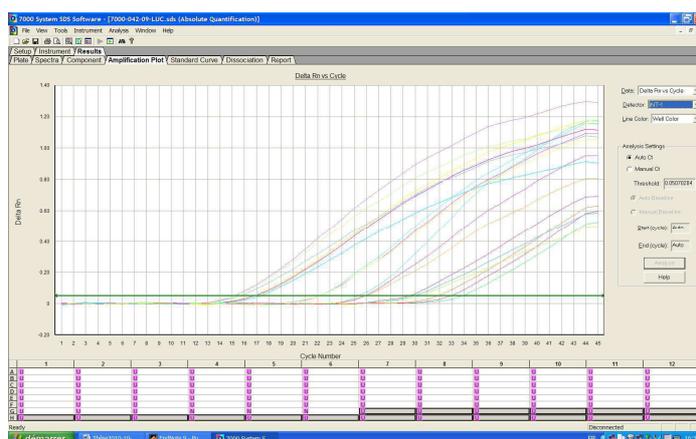
Regucalcine, FGFBP1 : Amorces difficiles à dessiner. Les CT de sortie des échantillons sont en dehors de la gamme, ne permettant pas une quantification. Instabilité de la gamme qui ne donne pas des résultats reproductible d'une PCR à l'autre (Figure 21).

MAPK7, Papoa: Amorces difficiles à dessiner. Instabilité des gammes.

## A. Adipophiline



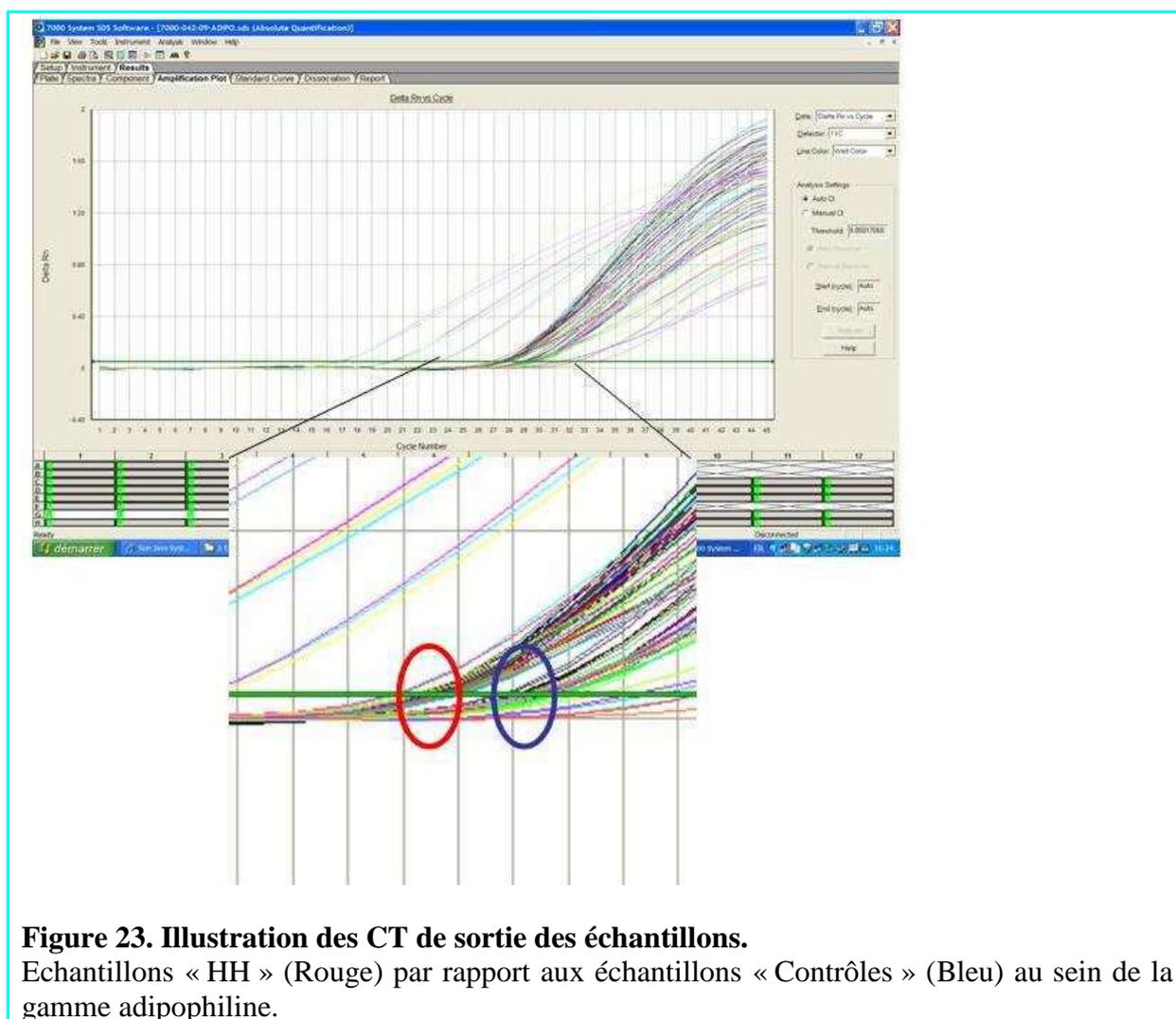
## B. Luciferase



**Figure 22. Illustration des profils de gammes obtenus pour l'analyse de l'ARN de l'adipophiline (A) et Luciferase (B).**

FGFBP1, MAPK7, PAPOA) (Figure 21). Il y a 6 jours d'écart entre les qPCR1, 2 et 3, un mois entre qPCR3 et 4 et 2 mois entre qPCR4 et 5 montrent que les points sont bien alignés, avec une pente montrant une bonne efficacité de PCR (-3,32 attendu, -3,62 et -3,52 obtenus pour luciférase et adipophiline respectivement) avec de bons coefficients de détermination ( $R^2$  proches de 1). Ces gammes permettent des quantifications de 9 à 937000 copies pour l'ARNm de l'adipophiline et 20 à 2 millions de copies pour l'ARNm de luciférase.

Le transcrit d'adipophiline semblait sur-exprimé au sein des embryons issus de mères HH (ratio environ 1,5). Or, L'Adipophiline est une protéine impliquée dans la formation des gouttelettes lipidiques et joue un rôle dans le stockage des lipides. Pour ces raisons, notre attention s'est focalisée sur ce transcrit. Nous avons pu mettre au point une RT-PCR quantitative afin de confirmer ce résultat (Figure 22). Concernant les solutions de gamme d'adipophiline et du transcrit rapporteur luciférase, nous pouvons constater que les points de Ct de sortie surviennent à intervalles réguliers. Les courbes de quantification obtenues.



**Figure 23. Illustration des CT de sortie des échantillons.**

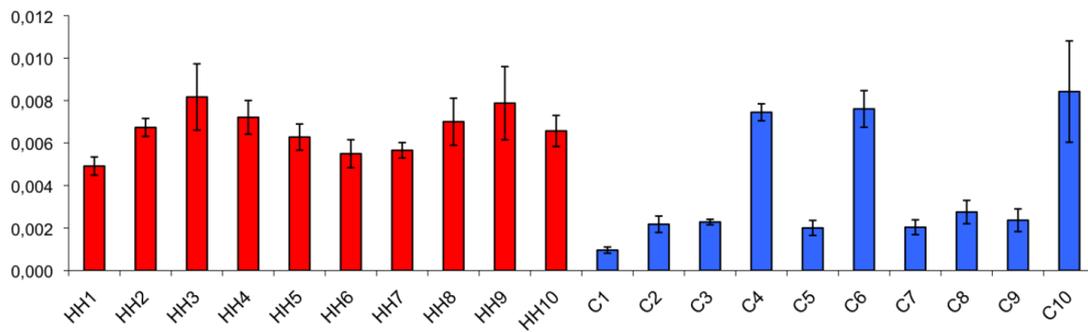
Echantillons « HH » (Rouge) par rapport aux échantillons « Contrôles » (Bleu) au sein de la gamme adipophile.

La Figure 23 illustre les résultats de la qPCR de l'adipophiline.

Les quantités absolues de molécules de transcrite adipophiline au sein des échantillons HH et C sont  $2321 \pm 180$  vs  $1205 \pm 250$  copies respectivement. Ce résultat de sur-expression de l'adipophiline a été confirmé après normalisation par luciférase : l'expression de l'adipophiline est plus importante dans le groupe HH que dans le groupe C :  $0,02 \pm 0,001$  vs  $0,012 \pm 0,002$  ( $p < 0,05$ ) (Figure 24). Il est également intéressant de constater que la quantité moyenne de transcrite d'adipophiline est très variable dans le groupe C avec certains échantillons montrant un haut niveau d'expression. Au contraire dans le groupe HH, l'expression d'adipophiline est plus importante mais moins variable

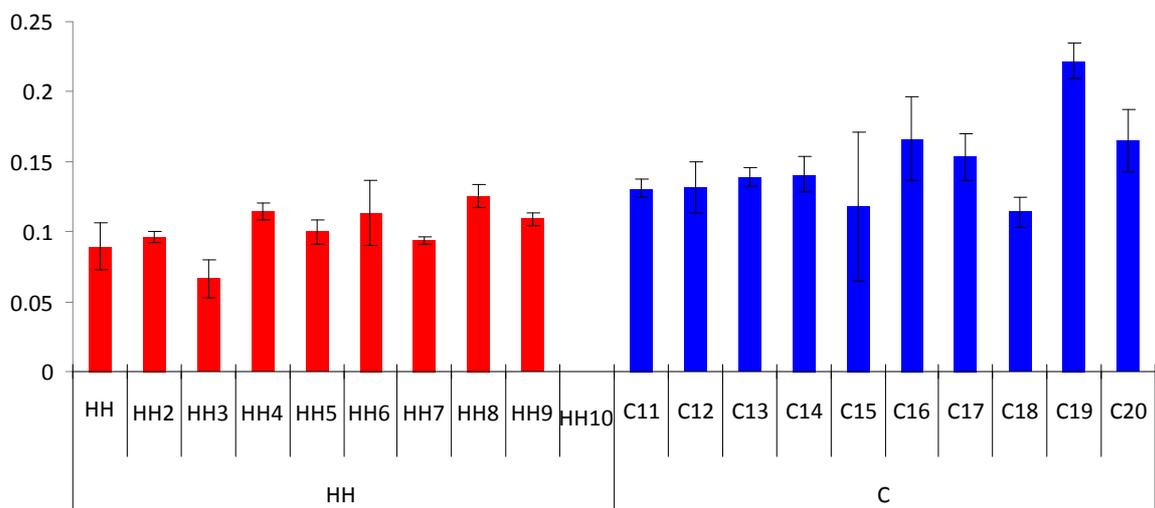
### 3.3.3. *L'analyse par qRT-PCR montre que le régime HH n'induit plus de sur-expression de l'adipophiline au stade blastocyste*

Au stade blastocyste (J5,5), l'analyse a porté sur 10 embryons HH et 10 embryons C pris individuellement et sélectionnés avec des critères morphologiques identiques (taille, aspect, régularité) grâce aux photos prises au moment du recueil. Au contraire du stade 48h PC, nous avons retrouvé une sous-expression de l'adipophiline au sein des embryons HH :  $0,101 \pm 0,006$  vs  $0,148 \pm 0,01$ ;  $p < 0,01$ , IC 95%  $]-0,07; -0,015[$  (Figure 25).



**Figure 24. Quantification de transcrit de l'Adipophiline à 48h post-coitum.**

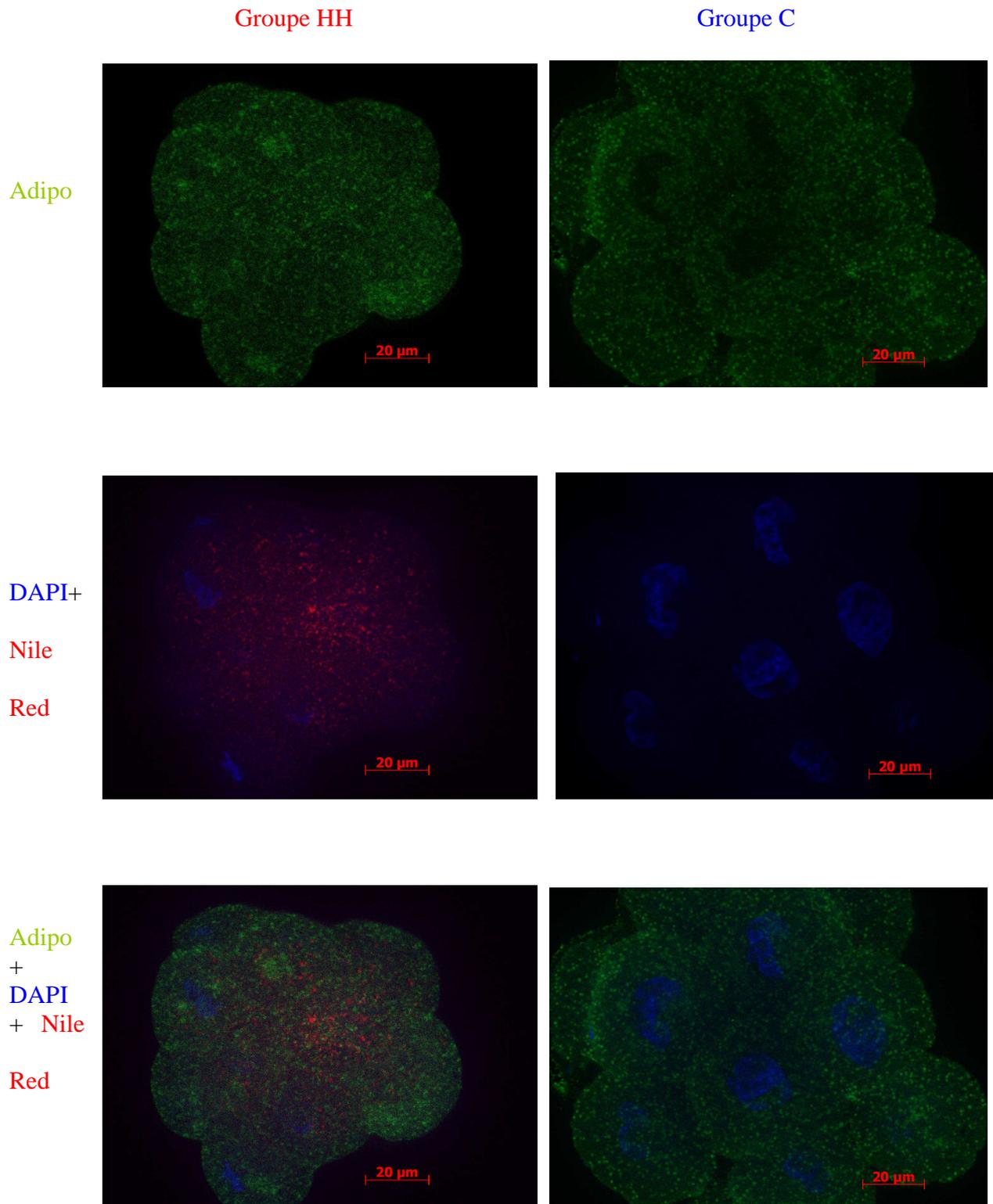
10 lots de 10 embryons des groupes HH (HH1 à HH10) et C (C1 à C10), après normalisation par le rapporteur exogène, l'ARN luciférase. Chaque pool a été analyse en triplicate.



**Figure 25. Quantification du transcrit de l'adipophiline au stade blastocyste.**

10 embryons issus de mère HH vs 10 embryons issus de mère C après normalisation par le gène rapporteur exogène (luciférase).



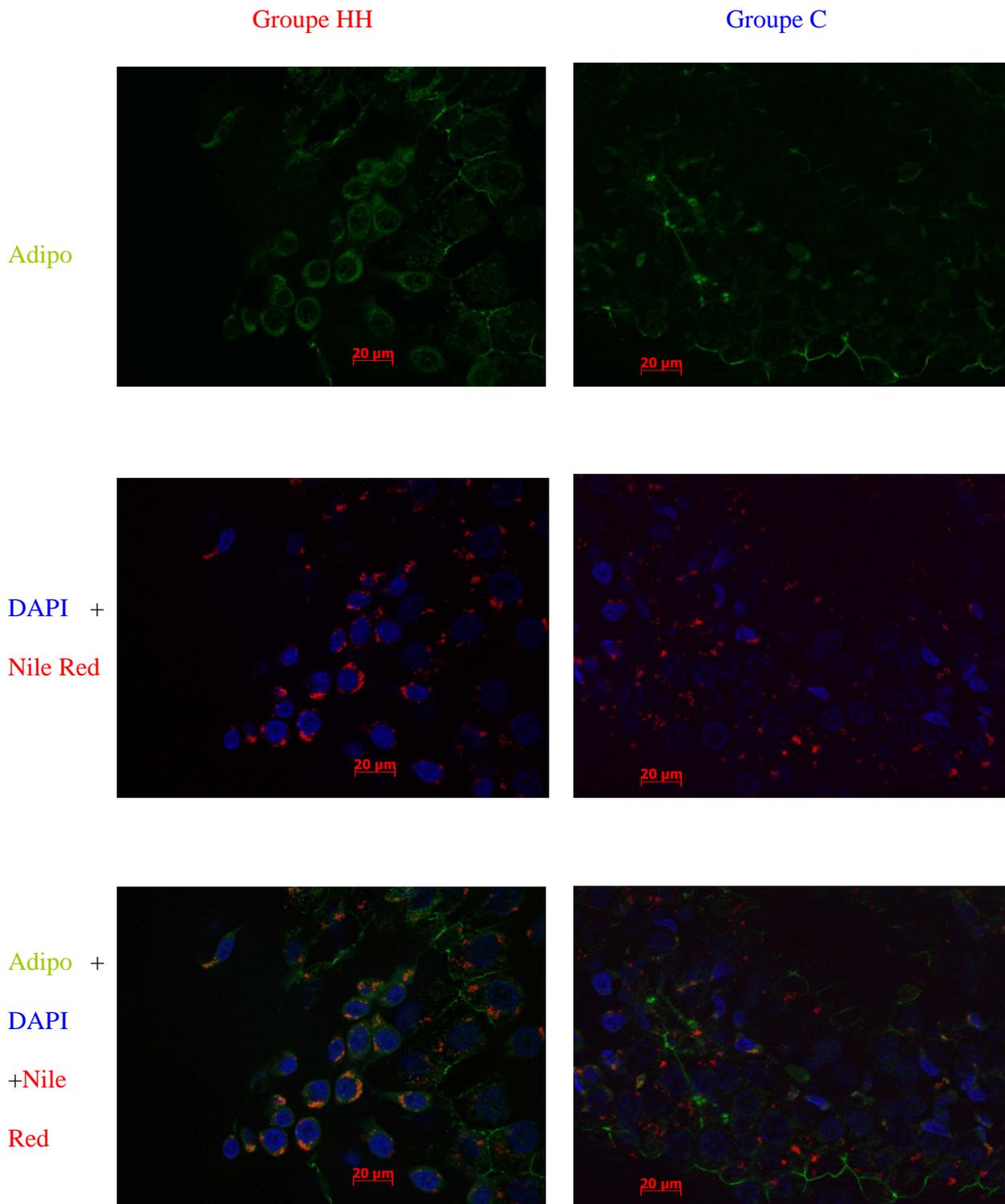


**Photo 9. Embryons issus de mères nourries par le régime HH ou C, à J2.**

Vert : Adipophiline, Bleu : noyau (DAPI), Rouge : lipides (Nile Red). Axio Observer Z1 (Zeiss) équipé d'un système d'illumination structuré apotome et d'un objectif Plan Achromate 63X (Ouverture numérique=1,4). Temps d'acquisition : DAPI 10ms, Adipophiline 400ms, Nile Red 120ms.

#### *3.3.4. L'analyse immuno- histologique montre une plus grande quantité de gouttelettes lipidiques au sein des embryons HH au stade J2 de l'expérience 1*

L'analyse a porté sur 17 embryons issus de mères nourries par le régime HH et 10 embryons issus de mères nourries par le régime C (protocole expérimental 1: régime HH vs C depuis l'âge de 10 semaines). L'analyse met en évidence l'Adipophiline dans les deux groupes, cependant sans différence notable (Photo 9 A) : le marquage est diffus, sans localisation préférentielle. Cependant, ce qui est frappant est l'absence de visualisation de gouttelettes lipidiques dans le groupe C alors que l'on en voit dans l'embryon HH (Photo 9 B). Ceci a été retrouvé au cours de deux répétitions différentes alors que les embryons des deux groupes ont été manipulés en même temps et que le marquage a bien fonctionné sur les embryons HH.

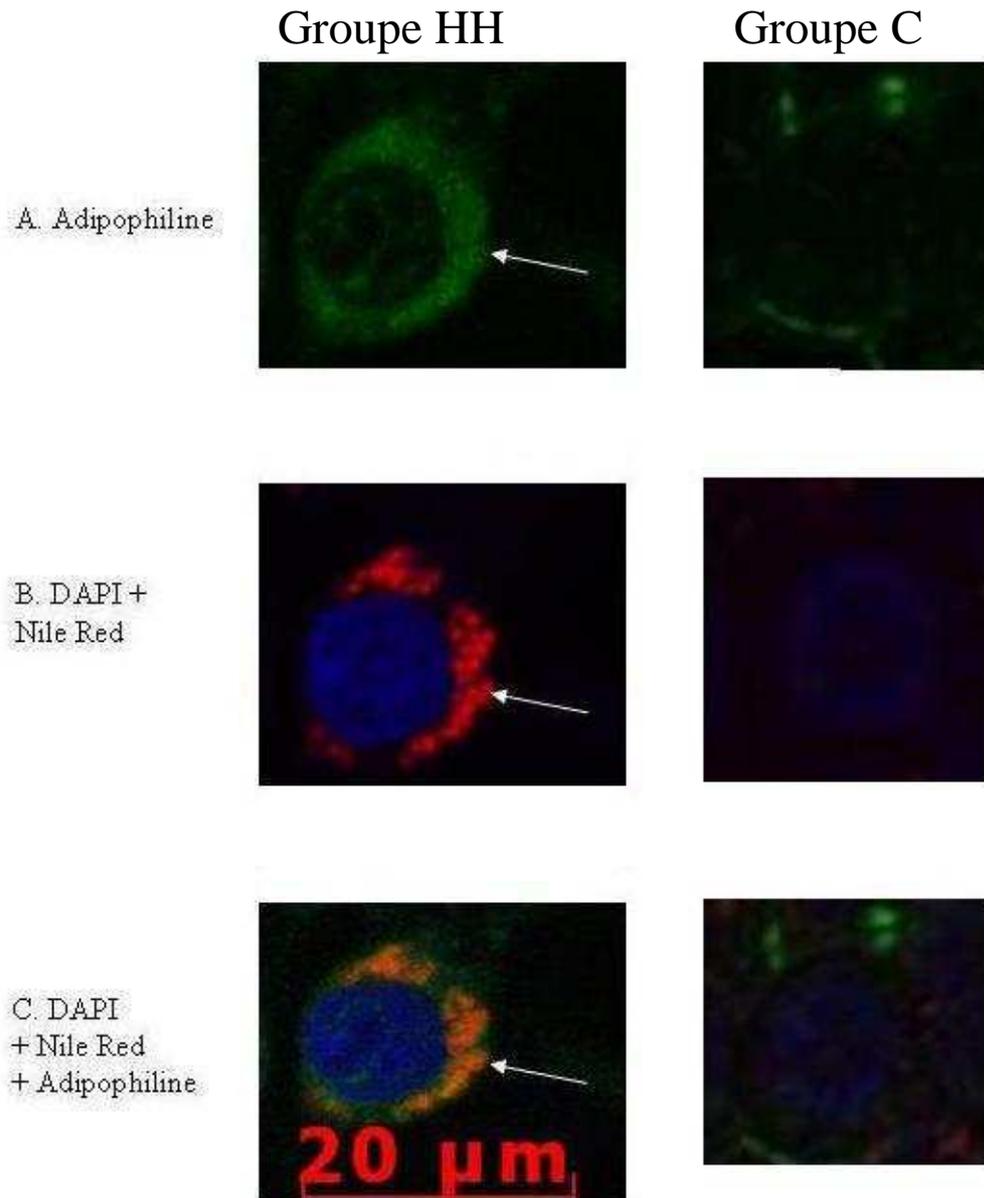


**Photo 10. Embryons issus de mères nourries par le régime HH ou C, à J5.**

Vert : adipophiline, Bleu : noyau (DAPI), Rouge : lipides (Nile Red). Axio Observer Z1 (Zeiss) équipé d'un système d'illumination structuré apotome et d'un objectif Plan Apochromate 63X (Ouverture numérique=1.4). Temps d'acquisition : DAPI 10ms, Adipophiline 400ms, Nile Red 120ms.

*3.3.5. L'analyse immunohistologique montre la plus grande quantité de gouttelettes lipidiques présentes chez les embryons HH de l'expérience 1 au stade blastocyste*

L'analyse a porté sur 35 embryons issus de mères nourries par le régime HH et 30 embryons issus de mères nourries par le régime C (protocole expérimental 1: régime HH vs C depuis l'âge de 10 semaines). L'analyse montre que la protéine Adipophiline (marquage vert) est localisée autour des gouttelettes lipidiques (marquage rouge) qui sont en quantité plus importante dans les embryons du groupe HH (Photo 10). De plus on note une localisation de ces gouttelettes à proximité des noyaux (marquage DAPI, bleu) (Photo 11) qui n'existe pas au sein des embryons du groupe C, et surtout au niveau du trophoctoderme.



**Photo 11. Cellule issue d'un embryon du groupe HH et C au stade blastocyste J5, agrandissement de la Photo 10.**

On visualise nettement les gouttelettes lipidiques (rouge) qui se localisent autour du noyau (bleu). En A on visualise nettement l'Adipophiline qui dessine une couronne et qui entoure les gouttelettes (Flèche, B). Axio Observer Z1 (Zeiss) équipé d'un système d'illumination structuré apotome et d'un objectif Plan Apochromate 63X (Ouverture numérique=1,4). Temps d'acquisition : DAPI 10ms, Adipophiline 400ms, Nile Red 120ms.

**E. Expérience 2 : Régime HH ou C à partir de 18 semaines après la naissance, moment de la mise à la reproduction**

HH: Hyperlipidique Hypercholestérolémique (SC0,2%)

VS

C: Contrôle à partir de la saillie

← Exp. 2 →

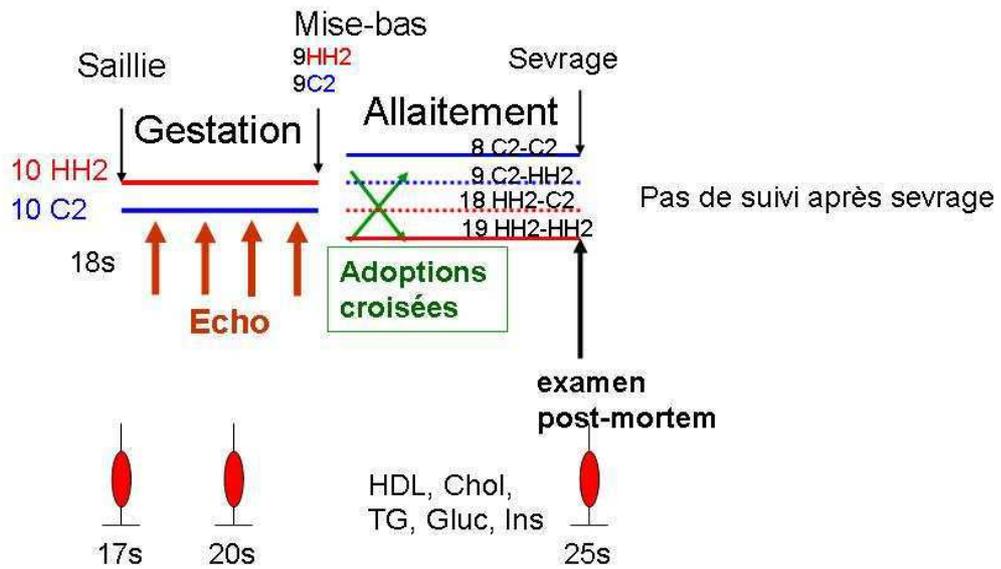


Figure 26. Protocole Expérimental. Expérience 2 : régime HH ou C débuté à 18 semaines, poursuivi jusqu'au sevrage. Pas de suivi à long terme.

## 1. Matériels et Méthodes

Vingt femelles ont reçu soit le régime HH (HH2, n=10) soit le régime Témoin (C2, n=10) à partir de la mise à la reproduction à 18 semaines (Figure 26). Par la suite, le protocole expérimental a été le même que dans l'expérience 1 : le suivi du poids et de la prise alimentaire des mères, le suivi échographique et le suivi post natal des lapereaux, les prises de sang ont été réalisées de la même façon à 17 semaines, juste avant la mise à la reproduction faite à 18 semaines, à 19 semaines (mi-gestation) et 25 semaines (sevrage). Les lapereaux ont été répartis en portées de 6, formant 4 sous groupes. Le protocole expérimental est schématisé en

### Figure 26.

Descendants de mères nourries par le régime HH2 et allaités par une mère nourrie par un régime HH2 (HH2-HH2).

Descendants de mères nourries par le régime HH2 et allaités par une mère nourrie par un régime C2 (HH2-C2).

Descendants de mères nourries par le régime C2 et allaités par une mère nourrie par un régime HH2 (C2-HH2).

Descendants de mères nourries par le régime C2 et allaités par une mère nourrie par un régime C2 (C2-C2).

Tous les animaux (mères et descendants) ont été pesés et euthanasiés au sevrage selon le protocole détaillé dans le Matériels et Méthodes communs.

	Groupe	Age (semaines)		
		17 semaines (juste avant mise sous régime)	20 semaines (mi-gestation)	25 semaines (sevrage)
<b>Cholesterol Total (mmol/L)</b>	<b>C2</b>	1,81 ± 0,15	1,75 ± 0,23*	1,76 ± 0,7*
	<b>HH2</b>	1,85 ± 0,09	5,43 ± 1,23	11,00 ± 3,01
<b>HDL (mmol/L)</b>	<b>C2</b>	1,14 ± 0,09	0,76 ± 0,05*	0,69 ± 0,08*
	<b>HH2</b>	1,07 ± 0,06	1,04 ± 0,05	10,94 ± 0,09
<b>Triglycerides (mmol/L)</b>	<b>C2</b>	0,46 ± 0,03	0,95 ± 0,27	0,87 ± 0,09
	<b>HH2</b>	0,57 ± 0,05	0,82 ± 0,07	1,07 ± 0,17
<b>Glucose (mmol/L)</b>	<b>C2</b>	7,24 ± 0,32	7,66 ± 0,4	8,57 ± 0,4
	<b>HH2</b>	7,54 ± 0,41	8,36 ± 0,64	8,69 ± 0,55
<b>Insuline (mmol/l)</b>	<b>C2</b>	0,25 ± 0,05	0,38 ± 0,02	0,24 ± 0,04*
	<b>HH2</b>	0,32 ± 0,10	0,69 ± 0,23	0,56 ± 0,06

**Tableau 4. Expérience 2: Moyennes ± SEM des concentrations à jeun de: cholestérol total, HDL, triglycérides, insuline et glucose des femelles en fonction de l'âge et du régime.**

C: régime contrôle, HH: régime hypercholestérolémique hyperlipidique, ND: non déterminé.  
\*indique une différence significative entre les deux groupes ( $p < 0,05$ ).

## **2. Résultats de l'Expérience 2: Le régime HH donné au moment de la mise à la reproduction n'induit pas de retard de croissance intra utérin mais induit de l'athérosclérose chez les descendants.**

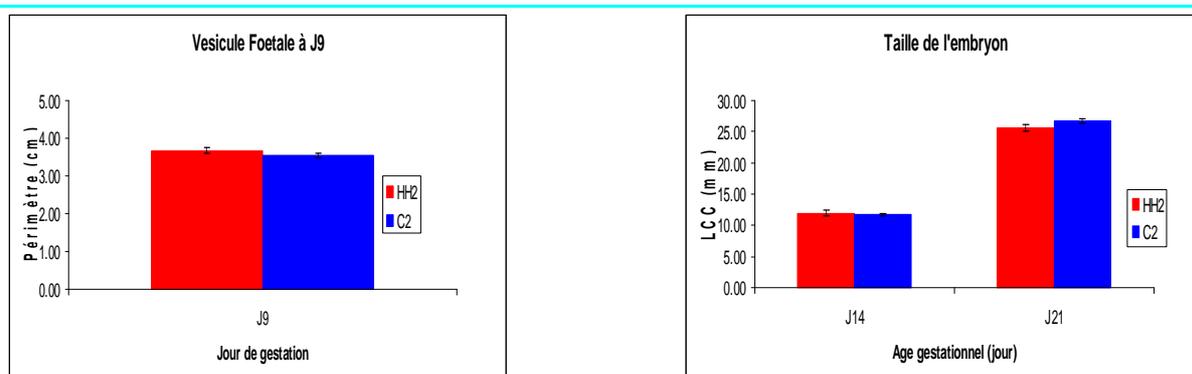
Dans cette expérience, l'alimentation hypercholestérolémique hyperlipidique est donnée à partir de 18 semaines, âge de la mise à la reproduction.

### **2.1. *Le Régime HH administré à partir de la mise à la reproduction induit une dyslipidémie, de l'athérosclérose, sans obésité chez les mères***

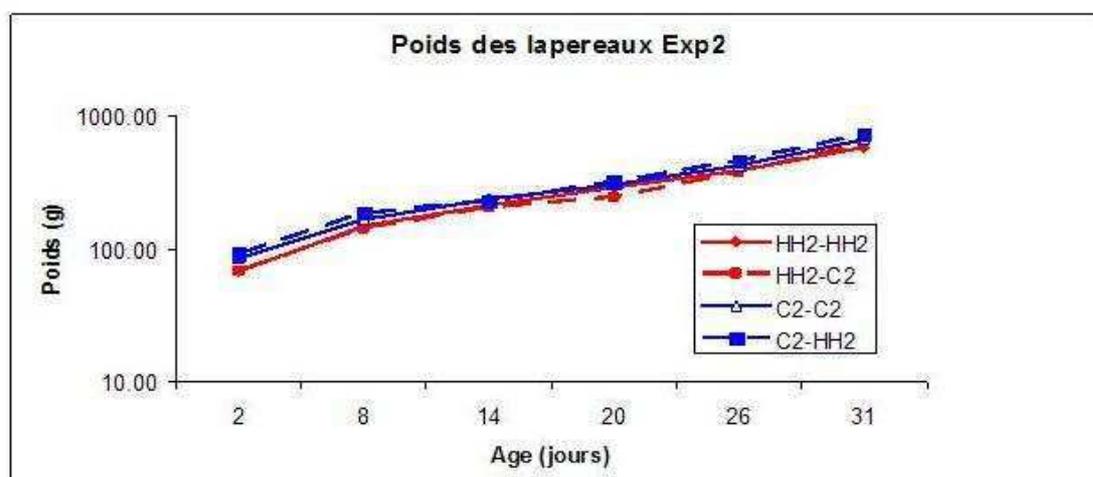
La prise hebdomadaire de poids pendant la gestation n'était pas significativement différente entre les deux groupes de mères (HH2 et C2). Comme observé avec l'expérience 1, les lapines sous régime HH mangeaient moins, mais ingéraient une plus forte quantité de lipides pendant la gestation (poids moyen de lipides ingérés par semaine:  $801 \pm 98\text{g}$  vs  $226 \pm 38\text{g}$ ;  $p < 0,01$ ). Les taux de cholestérol total et d'HDL étaient significativement plus élevés à mi-gestation dans le groupe HH2 ( $5,43 \pm 1,23$  vs  $1,75 \pm 0,23\text{mmol/L}$ ;  $p < 0,01$  et  $1,04 \pm 0,05$  vs  $0,76 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) mais glycémie, insulinémie et triglycéridémie n'étaient pas différentes ( Tableau 4 ). Des lésions athérosclérotiques n'ont été observées que dans la moitié des mères autopsiées au moment du sevrage. Ces lésions couvraient  $0,11 \pm 0,12\%$  de la surface des aortes.

	Expérience 2		
	C2	HH2	
Nombre de femelles gestantes	9/10	9/10	NS
Nombre de lapereaux obtenus	48	66	
Nombre de lapereaux par femelle	5,33 (2-7)	7,62 (6-10)	p<0,05
Poids de naissance	42,3 +/-11,7g	42,5 +/-7,4g	NS
Taux de survie à la naissance	85,32%	92,05%	NS

**Tableau 5. Expérience 2. Issue de la gestation : Nombre de descendant et survie.**



**Figure 27. Mesure par échographie de la vésicule fœtale à J9 et des longueurs embryonnaires à J14 et J21. Il n'existe aucune différence entre les deux groupes HH2 et C2.**



**Figure 28. Suivi du poids des lapereaux jusqu'au sevrage (expérience 2). Echelle de poids en log (g).**

## **2.2. *Le Régime HH administré à partir de la mise à la reproduction n'induit pas de retard de croissance intra utérin (RCIU)***

Aucun RCIU n'a été retrouvé par échographie. Le périmètre de la vésicule fœtale, et les longueurs embryonnaires à J14 et J21 n'étaient pas différentes (Figure 27).

La taille des portées était plus petite dans le groupe C ( Tableau 5 ). Le taux de survie n'était pas statistiquement différent ( Tableau 5 ). Il n'y avait pas non plus de différence entre les groupes pour le poids total ( $42,3 \pm 11,7\text{g}$  vs  $42,5 \pm 7,4\text{g}$ ).

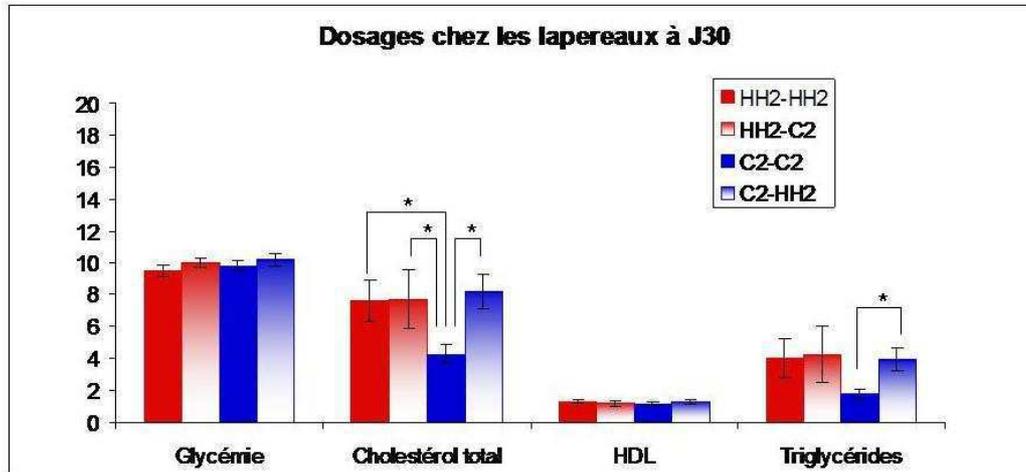
## **2.3. *Le régime HH a partir de la mise à la reproduction induit des lésions aortiques dans la descendance au sevrage***

Au sevrage, des lésions d'athérosclérose ont été retrouvées au niveau des aortes de 3 de 40 lapereaux, 2 dans le groupe HH2-HH2 et 1 dans le groupe HH2-C2 (Photo 12).

## **2.4. *Au sevrage, il n'existe pas de différence de poids et il existe une hyperlipidémie chez les lapereaux sous mères HH***

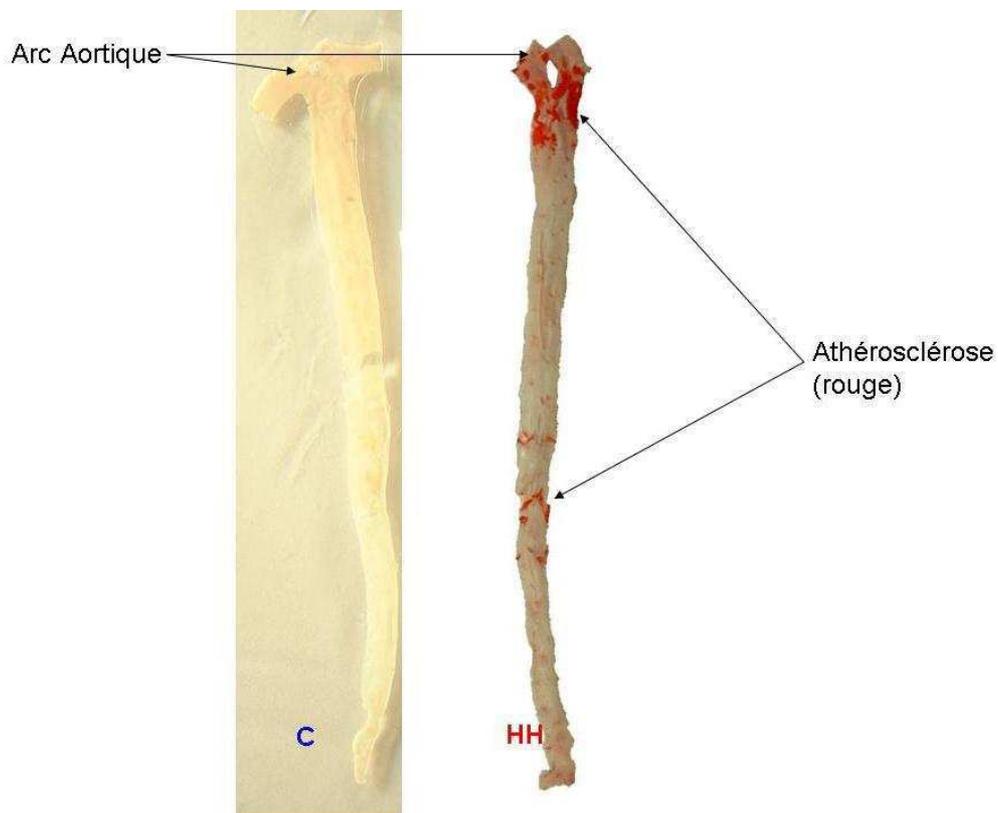
Le poids des différents groupes de lapereaux n'est pas différents pendant la période d'allaitement (Figure 28). L'autopsie n'a pas montré de différence entre les deux groupes pour le poids total et le poids des différents organes.

La concentration plasmatique de cholestérol total était plus élevée dans le groupe HH-HH2 vs C2-C2 ( $7,64 \pm 1,26 \text{ mmol/l}$  vs  $4,26 \pm 0,59 \text{ mmol/l}$ ;  $p < 0,05$ ) et dans le groupe C-HH2 vs C-C2 ( $8,2 \pm 1,07 \text{ mmol/L}$  vs  $4,26 \pm 0,59 \text{ mmol/L}$ ;  $p < 0,05$ ). Les concentrations plasmatiques de HDL n'étaient pas différentes entre les différents groupes et les glycémies à jeun n'étaient pas différentes entre les différents groupes. Les concentrations plasmatiques de triglycérides étaient plus basses dans le groupe C-C2 comparées au groupe C-HH2 ( $3,91 \pm 0,71 \text{ mmol/l}$  vs  $1,76 \pm 0,35 \text{ mmol/l}$ ;  $p < 0,05$ ) (**Figure 29**).



**Figure 29. Bilan biologiques au moment du sevrage.**

\* indique une différence significative :  $p < 0,05$



**Photo 12. Aortes prélevées au sevrage, expérience 2. Coloration à l'huile rouge.**

## **F. Résumé des résultats**

			Expérience 1	Expérience 2
Mères	Gestation	Hypercholestérolémie	oui	oui
		Hypertriglycémie	oui	oui
		Hyperglycémie	non	non
		Résistance à l'insuline	oui	non
	sevrage	Athérosclérose	100%	50%
Lapereaux		Croissance fœtale	HH<C	HH=C
		Poids de naissance	HH<C	HH=C
		Athérosclérose	non	oui
		Poids au sevrage	HH=C	HH=C

**Tableau 6. Comparaison des principaux résultats obtenus avec le régime HH lors des parties communes des expériences 1 et 2.**

Expérience 1 : régime débuté à 10 semaines, mise à la reproduction à 18 semaines.

Expérience 2 : régime et mise à la reproduction à 18 semaines.

L'originalité de cette étude comparée aux études précédentes sur l'effet du régime hypercholestérolémique (HH) est que nous avons analysé les effets depuis le stade embryonnaire précoce jusqu'à l'âge adulte, en passant par un suivi échographique anténatal.

Nous avons montré que ce régime HH débuté plusieurs semaines avant la conception et poursuivi pendant la gestation et l'allaitement induit chez les mères une athérosclérose et une hyperinsulinémie gestationnelle sans augmentation des glycémies (insulino résistance).

Nous avons également montré que l'expression génique est modifiée dès le stade de l'activation de la transcription du génome embryonnaire (48h post-coïtum, 8-16 cellules) : la sur-expression de l'adipophiline a été confirmée en qRT-PCR. Cette sur-expression est transitoire puisqu'à un stade plus tardif (J5), l'expression est diminuée. La quantité et la répartition des gouttelettes lipidiques est également différente, plus abondante dans le groupe HH aux stades J2 et J5 avec une localisation au niveau du trophoctoderme et périnucléaire au stade J5.

Nous avons montré que le régime HH induit un RCIU précoce et un petit poids de naissance lorsque ce régime est débuté plusieurs semaines avant la conception, ce qui n'est pas le cas lorsque le régime est débuté au moment de la mise à la reproduction (Tableau 6). Pour ces lapereaux nés avec un plus petit poids, le rattrapage de poids post-natal a permis de retrouver un poids moyen égal aux témoins au sevrage, mais ensuite, ces lapins sont devenus en surpoids par excès de tissus adipeux malgré une alimentation normale. Ils sont également devenus hypertendus, sans qu'aucune lésion d'athérosclérose n'ait pu être décelée macroscopiquement.



## **G. Discussion globale**



## 1. Difficultés rencontrées

Au cours du déroulement de ces expériences, nous avons été confrontés à plusieurs difficultés.

En ce qui concerne l'animalerie, une épidémie s'est déclarée au sein de l'élevage avec une mortalité importante. La lapinerie a également déménagé et pendant ce temps là aucun animal n'a été mis à la reproduction. Ainsi, il a fallu répéter plusieurs séries d'animaux.

Concernant l'aspect biologie moléculaire, la principale difficulté est liée à la rareté du matériel biologique, vu les difficultés et les délais d'obtention des embryons en nombre suffisant. La quantité d'ARN au sein des embryons de lapin au stade de la mise en route du génome rend difficile la mise au point d'une Q-PCR fiable et reproductible : chaque embryon contient entre 2,5 et 5ng d'ARN totaux. Ainsi, en ce qui concerne les autres gènes suspects mis en évidence par le réseau d'ADNc dédié nous avons essayé de jouer sur plusieurs points. Nous avons essayé de dessiner plusieurs fois des amorces. Or ces gènes possèdent de fortes répétitions de séquences. Les amorces avaient donc tendance à dimeriser et à ne pas amplifier correctement la cible. Non seulement la quantité d'ARN total est faible dans les embryons aux stades étudiés, mais l'expression des gènes est elle-même assez faible. Ainsi lorsqu'une amplification correcte était obtenue, il n'était pas rare que la quantification précise ne soit pas possible rendant impossible toute interprétation. Les difficultés étaient moindres pour un des transcrits, l'Adipophiline. En étudiant ce qui était connu sur ce gène, il nous apparut comme un excellent gène candidat sur lequel il fallait porter nos efforts. Pour démontrer statistiquement qu'une faible différence est significative il faut augmenter les tailles des



échantillons. Pour faire le calcul d'effectif nécessaire nous avons utilisé la formule de calcul de puissance utilisée en épidémiologie, par exemple pour calculer le nombre de patients nécessaires à inclure par exemple dans une étude médicament vs placebo. Nous avons d'abord mis au point une PCR test dans laquelle nous avons placé des tubes avec une quantité N d'ARN d'adipophiline et des tubes avec une quantité 1,5N. L'analyse du résultat nous a permis d'avoir les éléments nécessaires au calcul. Nous avons ainsi pu démontrer pour que pour montrer une différence d'un facteur 1,5 entre les deux groupes il fallait 10 échantillons de chaque condition. Comme chaque échantillon était constitué de 10 embryons, il fallait donc avoir 100 embryons morphologiquement corrects issus de mères sous régime HH et 100 issus de mères sous régime Contrôle. Il était donc impératif de rassembler les embryons car il était impossible d'obtenir 100 embryons corrects pour une seule lapine.

En tant que médecin, être confronté à ces difficultés propres à la recherche fondamentale aura été quelque chose de très enrichissant. Renforcer le lien entre la médecine, la recherche clinique et la recherche fondamentale, est une des motivations principales qui m'ont fait me lancer dans ce projet de thèse.



## 2. Choix du modèle

La critique principale qui peut être faite à nos protocoles expérimentaux est le choix du modèle lapin et du régime.

Les raisons qui nous ont fait choisir ce modèle animal sont expliquées en début de ce mémoire. Il n'en reste pas moins qu'une des limites principales est que le génome du lapin n'est actuellement que partiellement séquencé et l'annotation de ce génome est donc incomplète. De plus, la membrane à ARN utilisée ne couvre que 2000 contigs. Ces points seront résolus dans un avenir proche puisque le séquençage a été récemment complété (Rabbit Genome project : [www.broadinstitute.org/community/science/projects/mammals-models/rabbit/rabbit-genome-project](http://www.broadinstitute.org/community/science/projects/mammals-models/rabbit/rabbit-genome-project)), l'annotation du génome lapin est en cours et une autre membrane couvrant plus de contigs va être réalisée.

L'autre élément criticable de notre modèle est la caecotrophie. Un élément qui n'a pas été étudié au cours de ces expérimentations est la composition des déjections des lapins. Nous n'avons pas de données sur la caecotrophie et son rôle dans la digestion des lipides.



### 3. Régime alimentaire

Le régime alimentaire normal du lapin est très éloigné du régime humain. L'objectif était d'étudier l'effet de l'hypercholestérolémie et de l'hyperlipidémie liée à l'alimentation bien que la quantité de lipides ingérée par le lapin soit bien inférieure à celle ingérée par les hommes. La composition que nous avons choisie est issue de la littérature.

On pourrait cependant se demander si les perturbations que nous avons observées ne sont que le reflet d'un régime tout simplement pas adapté à cet animal, plus qu'à l'hypercholestérolémie elle-même. Or, si l'on se réfère aux études sur l'athérosclérose, le métabolisme lipidique proche de l'humain fait du lapin un modèle de choix pour cette pathologie. Ainsi, c'est bien l'effet de l'hypercholestérolémie que nous avons observé.

L'huile de soja a été choisie car elle fournit un bon ratio d'acides gras essentiels. De plus, elle contient également des acides gras polyinsaturés<sup>150</sup>. Dans notre étude, l'effet du cholestérol et de ces éléments sont donc confondus.

Un des inconvénients du soja est qu'il contient des phytoestrogènes. Sa consommation expose donc à des taux d'hormones potentiellement importants qui peuvent interférer avec le développement fœtal ou post natal. L'excès d'oestrogènes peut induire par exemple des anomalies du développement sexuel chez les mâles, voire impacter la croissance<sup>151</sup>. Cependant, si les phyto-oestrogènes sont abondantes dans les graines, la quantité présente dans l'huile de soja est très faible voire nulle selon la base de données du United States Department of Agriculture (USDA 2002) citée dans le rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (<http://www.afssa.fr/Documents/NUT-Ra-Phytoestrogenes.pdf>).



#### **4. Apports de la comparaison expérience 1- expérience 2**

La différence essentielle qui existe entre l'expérience 1 et l'expérience 2 est le moment du début du régime. Dans l'expérience 1 le régime (HH ou C) est débuté à 10 semaines après la naissance, en période pré pubertaire. Dans l'expérience 2 ce régime est débuté au moment de la mise à la reproduction. Or les effets physiologiques sur la gestation sont différents (Figure 31). En particulier, lorsque le régime débute au moment de la mise à la reproduction, il n'y a pas de RCIU. Ceci met en évidence le rôle majeur de la période pré et péri conceptionnelle. Il a été récemment montré que l'obésité maternelle préconceptionnelle est associée à des altérations du métabolisme mitochondrial chez les ovocytes et les zygotes de souris<sup>152</sup>.



Le régime peut avoir une influence sur l'ovocyte, ou sur l'embryon dans sa période préimplantatoire. D'autres études sont nécessaires au stade ovocytaire et à d'autres stades du développement embryonnaire pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les évènements observés dans notre modèle expérimental.

L'étude de Howie et al. publiée en 2009 suggère que la période périconceptionnelle n'a pas plus d'importance que la gestation elle-même et indépendamment de la période post natale.<sup>32</sup>

Dans son modèle expérimental développé chez le rat Wistar, Howie a donné un régime contrôle, ou un régime « high fat » (HF) depuis le sevrage des femelles jusqu'au sevrage de leurs ratons, ou à partir de la mise à la reproduction jusqu'au sevrage de leurs ratons. A partir de la naissance, tous les animaux ont reçu le même régime alimentaire contrôle. Les résultats de Howie montrent un petit poids de naissance et un surpoids à l'âge adulte des rats nés des mères ayant eu un régime HF, quel que soit le moment du début du régime.

Le point commun entre cette étude et la nôtre est l'effet de « programmation de l'obésité ». Cependant l'absence de rôle clé de la période préconceptionnelle peut être due à plusieurs éléments. Tout d'abord le modèle animal est différent : la placentation, le métabolisme lipidique, la mise en route du génome embryonnaire se font de façon différente entre le modèle rat choisi par Howie et le modèle Lapin que nous avons utilisé (Cf. justification du modèle). Ensuite il est possible que l'ovocyte lui-même n'ait pas la même sensibilité au régime : il pourrait être « résistant » dans le modèle rat, et « sensible » dans le modèle lapin. Ceci mériterait d'autres expérimentations.

Cardozo et al.<sup>153</sup> ont publié en 2011 une revue de la littérature exhaustive sur le lien entre syndrome métabolique de la femme et sa qualité ovocytaire. Cet article démontre tant chez l'animal que chez l'humain, que l'obésité et la résistance à l'insuline sont associés à des défaut d'ovulation et des anomalies du développement embryonnaire précoce<sup>38</sup>.



Une étude du liquide folliculaire prélevé au moment des ponctions d'ovaires dans le but de fécondations *in vitro* a montré qu'en cas d'indice de masse corporelle élevé, les concentrations intra folliculaires d'insuline, de lactate, de triglycérides et de C-Reactive Protein (CRP, qui est un marqueur de l'inflammation) étaient élevées avec une concentration diminuée de stéroïde hormone binding protein<sup>154</sup>. La concentration élevée de CRP peut indiquer une inflammation ou un stress oxydatif qui peut altérer la qualité ovocytaire. Dans le cadre de l'infertilité de la femme, il est bien établi que la qualité ovocytaire des patientes ayant une obésité ou un syndrome métabolique (dans le cadre d'un syndrome des ovaires polykystiques) est moindre que pour les autres patientes. Cependant, la qualité ovocytaire est un marqueur de succès de la fécondation *in vitro*, mais il n'y a pas d'études faisant la corrélation entre faible qualité ovocytaire et devenir à long terme des enfants.

L'expérience 1 débute dès avant la puberté. Celle-ci se situe aux environs de 12 semaines. L'impact du régime sur l'ovocyte est donc peut être dû à cette période critique du développement. On ne sait pas si des lapines exposées pendant 8 semaines avant la mise à la reproduction au régime HH, après la période pubertaire, auraient développé les mêmes conséquences que dans notre expérience. Les complications liées aux grossesses pendant l'adolescence décrites par JM Wallace sont liées au conflit entre les besoins de la mère pour sa propre croissance et les besoins du conceptus pour son développement qui induirait une diminution de la taille du placenta, sans modification majeure de sa fonction, à l'origine de la diminution de taille du conceptus<sup>155</sup>. Afin de savoir si le moment précis du régime par rapport à la puberté a un réel impact, il faudrait décaler la mise sous régime, en démarrant par exemple vers 14 semaines avec une mise à la reproduction vers 22 semaines.

Des travaux réalisés dans le laboratoire ont évalué les conséquences du régime HH sur les ovaires. Des analyses histologiques ont montré que le régime HH induit une importante atresie folliculaire (M2 Ann-GAel Cordier, données non publiées). Cet effet visible peut laisser supposer l'existence d'anomalies génétiques ou épigénétiques.



## 5. Effets physiologiques du régime

### 5.1. Effets des régimes sur les mères

Les régimes utilisés n'ont pas induit d'obésité chez les mères mais une perturbation des bilans lipidiques, ce qui était l'effet recherché.

Dans l'étude de Mizogushi qui évalue les « normes » des bilans biologiques chez les lapines New Zealand White (même race que la nôtre) en dehors et pendant la gestation, il n'est pas fait mention de l'aliment ingéré ni de sa composition et l'insulinémi n'a pas été étudiée<sup>80</sup>. De plus les prises de sang n'ont pas été faites aux mêmes âges gestationnels, rendant difficile une comparaison. Cependant, on peut noter que, dans l'étude de Mizogushi et al., il y avait une diminution des glycémies au cours de la gestation alors qu'elles sont stables sur la même période de temps chez leurs témoins non gestantes, et que nos lapines ont des glycémies qui ont tendance à s'élever jusqu'à la mise bas dans les deux groupes (HH et C) sans qu'il y ait de différence significative entre ces deux derniers groupes. De plus, l'insulinémie est plus élevée dans le groupe HH vs C à l'âge de 20 semaines (mi-gestation, expérience 1). Elle n'est pas plus élevée au cours de la gestation dans l'expérience 2. Cette augmentation de l'insulinémie avec des glycémies normales est le témoin d'une insulino-résistance. Les causes de l'insulino-résistance pendant la gestation ne sont pas bien connues. Il peut s'agir d'un défaut qualitatif du récepteur de l'insuline, empêchant la liaison de l'insuline, d'un défaut quantitatif de ces récepteurs ou d'une anomalie de la voie de signalisation qui succède à la fixation de l'insuline à son récepteur. D'après Damm et al., il ne semble pas s'agir de la première hypothèse, la liaison insuline – récepteur n'est pas altérée pendant la grossesse<sup>156</sup>. Pour Buchanan et al, un des mécanismes induisant une perte de la sensibilité à l'insuline est l'adiposité maternelle et l'effet d'hormones placentaires<sup>157</sup>.

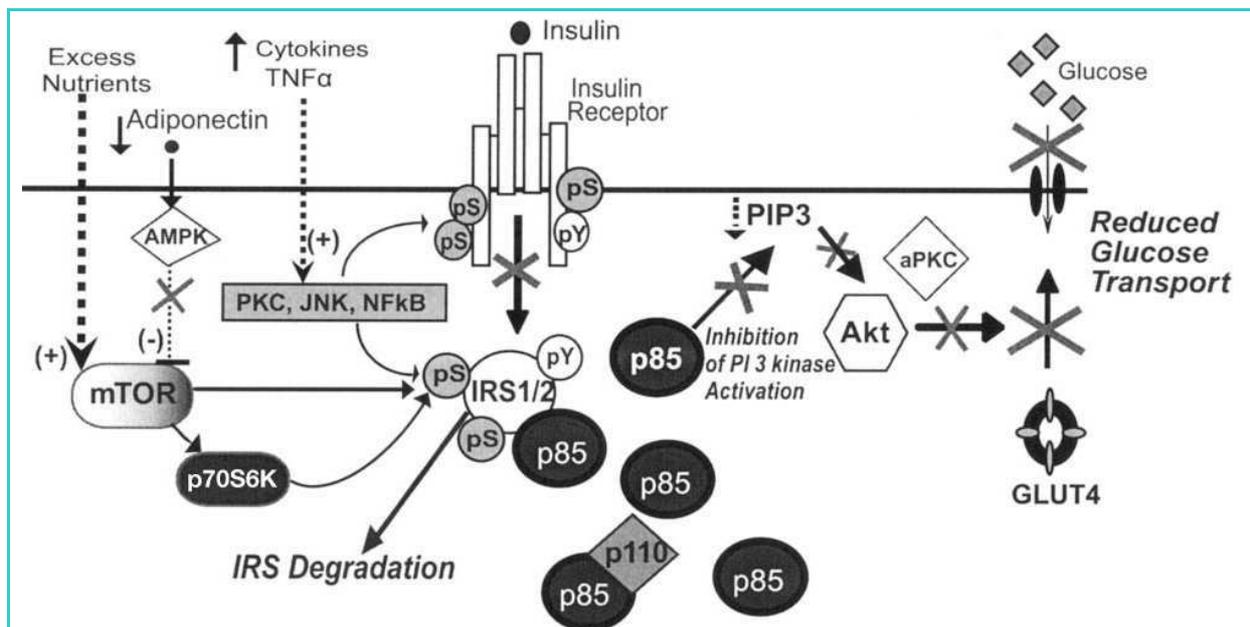


Les deux hormones placentaires semblant jouer un rôle important dans l'insulinorésistance sont l'hormone lactogène placentaire (hPL) et la human Placental Growth Hormon (hPGH) sans que les mécanismes moléculaires liés a ces hormones soient connus<sup>158</sup>.

Barbour et al. ont montré que les mécanismes de l'insulinorésistance sont multifactoriels, impliquant une diminution de la capacité de l'insuline d'induire la phosphorylation de son récepteur, une diminution de l'expression de IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) et une augmentation de la quantité de la sous unité p85 de la PI 3-kinase, ce qui réduit l'activité de cette enzyme<sup>158</sup>. Tout ceci aboutissant à une diminution de la translocation de GLUT4 vers la surface membranaire, et une diminution du passage intra-cellulaire du glucose (Figure 30).

L'Adiponectine qui est une hormone produite par les tissus adipeux qui joue un rôle important dans l'insulino sensibilité est diminuée chez les patientes présentant un diabète gestationnel et sa sécrétion diminue au cours de la grossesse. Sa diminution est donc corrélée avec la survenue de l'insulino resistance observée au cours de la deuxième partie de la grossesse. Le gène codant pour cette protéine n'est pas sur le réseau utilisé, on ne sait donc pas si l'expression de ce gène est modifiée par le régime. L'expression de PPAR  $\gamma$  qui est, entre autres, un facteur de transcription lipogénique, diminue au cours de la grossesse entrainant ainsi une augmentation de la lipolyse et de l'insulinorésistance. Ce gène est présent sur le réseau utilisé mais son expression n'apparaît pas modifiée par le régime HH.

L'ensemble de ces mécanismes induit une augmentation des glycémies et des taux acides gras libres circulant. Ainsi, l'inflammation, la diminution de l'Adiponectine, l'augmentation de la lipolyse contribuent à l'insulinorésistance<sup>158</sup>.



**Figure 30. Résumé des mécanismes potentiels de résistance à l'insuline normal dans le muscle squelettique en fin de grossesse et dans le diabète gestationnel de la femme avec interruption des systèmes enzymatiques (croix).**

La voie normale de stimulation par l'insuline du transport du glucose dans le muscle implique l'activation de la protéine récepteur de l'insuline, qui va entraîner la phosphorylation de IRS-1 et IRS-2 au niveau de résidus (pY). IRS-1 recrute la sous unité p85, sous-unité régulatrice de la PI 3-kinase, ce qui entraîne la phosphorylation de phospholipides membranaires avec production de phosphoinositol-3 ,4,5-phosphate [PIP3]. Cette production de PIP3 est nécessaire pour l'activation de Akt et la signalisation pour la translocation de GLUT4. D'après Barbour et al<sup>158</sup>.

Concernant les taux de cholestérol et de triglycérides, les résultats de nos dosages sont systématiquement supérieurs à ceux de Mizogushi, y compris dans le groupe Contrôle. Le seul point commun est la diminution des concentrations retrouvées en fin de gestation. Ces différences de dosages peuvent s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord la nature de l'aliment donné par Mizogushi et al. n'est pas connue, et les auteurs ne précisent pas si les prises de sang ont été effectuées à jeun, même si cela est très probable car les résultats des dosages de Mizogushi sont plus faibles que les nôtres. Dans notre étude, les prélèvements ont été faits le matin après une nuit de jeûne. Ensuite et surtout, la méthodologie utilisée pour les dosages est peut être différente. Nous avons utilisé une technique par « enzyme immunoassay » (Roche Diagnostics, Basel, Suisse) alors que Mizogushi, de façon surprenante, ne précise pas la méthode de dosage.

Le point le plus important reste qu'il existe une réelle différence entre le groupe C et le groupe HH au cours de nos deux expériences et que l'évolution globale des dosages est comparable même si les valeurs absolues ne le sont pas.



## **5.2. Impact du régime sur le développement placentaire**

Dans notre étude, la diminution du ratio poids fœtal/poids du placenta à J28 de la gestation indique une diminution de « l'efficacité » du placenta. Montoudis et al.<sup>81</sup>, en utilisant des femelles nourries par un régime hypercholestérolémique, ont démontré qu'une augmentation du cholestérol et des triglycérides sérique fœtaux était observée, associée à une diminution du poids et une accumulation de lipides au niveau du placenta<sup>81</sup>. Les données de l'équipe de Marseille-Tremblay et al. chez le lapin montraient qu'avec un régime enrichi à 0,2% de cholestérol donné à des lapines gestantes, la lipogénèse est principalement réalisée au niveau du foie maternel, alors que le placenta joue un rôle clé dans la synthèse du cholestérol : il y a une décroissance de la quantité de HMCoA-Reductase hépatique, sans modification de l'HMGCoA-Reductase placentaire, avec une augmentation de l'expression de Sterol Regulatory Element Binding Proteins 1 et 2 (SREBP) dans le noyau des cellules du placenta sous régime enrichi en cholestérol. L'expression de la Fatty Acid Synthase (FAS) n'est pas modifiée par le régime dans le foie des mères et le placenta, mais diminuée dans le foie des lapereaux<sup>82</sup>. Marseille-Tremblay et al. ont donc démontré que le placenta joue un rôle majeur dans la synthèse du cholestérol pendant la gestation alors que la lipogénèse est principalement assurée par le foie ; le placenta ne répond pas à une augmentation du cholestérol plasmatique, mais le foie diminue l'activité de HMG-CoA Reductase ; enfin, SREBP-1/2 peuvent moduler le métabolisme du cholestérol et des lipides indépendamment de HMG-CoA reductase et de FAS<sup>82</sup>. Ces gènes ne figurent pas sur le réseau utilisé dans nos expériences.

Marseille-Tremblay a également étudié la corrélation entre le métabolisme lipidique maternel et placentaire au sein de placentas humains à terme<sup>159</sup>. Les femmes présentant un taux élevé de cholestérol plasmatique avaient un taux élevé de LDL, de Apo-B100 et de triglycérides.



Cependant, les taux de cholestérol étaient normaux dans le sang fœtal au niveau du cordon ombilical. Dans le placenta, les taux de FAS et de SREBP-2, impliqués dans la lipogénèse, étaient significativement augmentés alors que l'expression de SREBP-1 et HMG-CoA reductase, impliqués dans la synthèse du cholestérol n'étaient pas modifiés par l'hypercholestérolémie maternelle<sup>159</sup>. L'expression du récepteur des LDL oxydés (OLR1) était également augmenté au sein des placentas à terme de femmes présentant des taux de cholestérol plasmatiques augmentés<sup>160</sup>. Or nous avons rapellé le rôle délétère des LDL oxydés dans l'athérosclérose. De plus, Wang et al. ont montré que l'expression de l'Adipophiline était augmentée dans les macrophages par les LDL oxydés<sup>161</sup>. Jones et al. ont évalué l'effet d'un régime enrichi en lipides débuté 8 semaines avant la mise à la reproduction jusqu'à 18 jours de développement embryonnaire chez la souris, montrant que le régime induit une augmentation du transfert transplacentaire du glucose et d'acides aminés neutres, liés à une augmentation de l'expression de leurs transporteurs placentaires (GLUT1, SNAT). Cependant cet auteur n'a pas étudié le devenir des conceptus exposés à ce régime<sup>162</sup>.

Il pourrait donc exister un lien entre les perturbations lipidiques maternelles, le placenta et nos observations qui sont une diminution du rapport poids fœtal/poids placentaire, un retard de croissance et l'augmentation de l'expression de l'Adipophiline (par l'intermédiaire des LDL oxydés). Il serait donc intéressant de travailler sur des gènes candidats liés au métabolisme lipidique qui s'expriment au niveau du placenta. Parmi les gènes candidats, on pourrait travailler sur les gènes liés à l'adipophiline (PPAR, RXR), aux protéines en rapport avec le transport d'acides gras (FABP), mais aussi Fatty Acid Synthase (FAS), SREBP, HMG Co A reductase...(Travaux en cours par A. Tarrade).



### **5.3. Impact du régime sur le développement fœtal**

La culture de l'embryon in vitro peut altérer la croissance et la morphogénèse embryonnaire<sup>163</sup> et placentaire<sup>164</sup>. Ceci peut être expliqué par l'existence de nombreux systèmes de régulations nutritionnelles présents au sein des tissus à des moments critiques du développement précoce<sup>165</sup>.

Watkins et al., en 2008, ont illustré l'importance de l'alimentation maternelle durant le développement embryonnaire pour le contrôle et la dynamique de croissance du conceptus ainsi que sur le risque de développement de maladies à l'âge adulte. Les conséquences néfastes de la restriction protéique durant la période pré-implantatoire sur le développement sont multiples et concernent la croissance globale, la physiologie cardiovasculaire et le comportement<sup>39</sup>. Cependant ces études évaluent essentiellement les effets d'une restriction protéique.

Dans des travaux réalisés suite à cette thèse, il n'y avait pas de différence entre les concentrations de leptine au cours de la gestation chez les mères HH par rapport aux C (Master 2 Ann Gael Cordier, données non publiées). Chez le rat, un traitement néonatal par la leptine en cas de RCIU reverse la susceptibilité à développer un syndrome métabolique et restaure un phénotype adulte normal<sup>166</sup> : le défaut de leptine en cas de RCIU peut donc participer à la mauvaise programmation métabolique, en induisant par exemple une résistance à la leptine à l'âge adulte. La Leptine étant une hormone régulant notamment l'appétit, ceci pourrait expliquer l'excès d'ingestion constaté dans le groupe HH-HH (Expérience 1).

Ozil et al. ont montré dans notre laboratoire que chez des embryons de souris, une perturbation des oscillations calciques embryonnaires, juste après la fécondation induisait une diminution du taux d'implantation embryonnaire malgré un développement normal jusqu'au stade blastocyste.<sup>167</sup> De plus, un pourcentage non négligeable de gène, environ 20% étaient



dérégulés par cette diminution des flux calciques au sein de l'embryon précoce. Cependant, il n'existe pas de différence de poids entre les souriceaux du groupe témoin et du groupe « oscillations calciques modifiées » à terme. Il n'y a pas eu de suivi postnatal des souriceaux.<sup>167</sup> Les oscillations calciques qui surviennent après la fécondation sont un des mécanismes essentiels de l'activation embryonnaire. Cette étude démontre qu'une perturbation au moment de la transition materno embryonnaire peut entraîner des anomalies de l'expression génique embryonnaire et du développement.

Une seule étude utilisant un régime hyperlipidique chez le rat a montré des effets similaires à notre travail, c'est-à-dire une tendance à l'obésité de la descendance, mais l'effet de la supplémentation n'a pas été étudié lorsqu'elle est donnée uniquement à partir de la mise à la reproduction et cette étude n'a donc pas pu démontrer d'effet délétère du régime préconceptionnel<sup>32</sup>. Dans notre étude, nous avons pu démontrer que le retard de croissance apparaît dès J9 de gestation, soit juste après l'implantation qui est à J6,5, confirmant que la période préimplantatoire est un élément clé pour le futur développement de l'embryon.

Nous n'avons pas pu réaliser d'évaluation de la croissance de façon longitudinale de chaque lapereau pendant toute la gestation, les difficultés techniques nous empêchant d'être certains de bien mesurer le même lapereau d'une part et d'autre part, les parties mesurables de chaque fœtus n'étaient pas strictement identiques au cours du temps. Il est possible que l'utilisation de sondes dédiées à l'expérimentation sur petits animaux nous permette dans l'avenir un meilleur suivi échographique prénatal. Polisca et al. ont publié un article sur l'échographie chez la lapine gestante<sup>128</sup>. En utilisant une sonde microconvexe de 5,5 à 7,5Mhz, cette équipe a pu caractériser les flux Doppler au niveau du cordon ombilical, de l'aorte, de la veine cave, à l'aide d'index de mesures utilisés habituellement chez la femme (pic systolique, vitesse diastolique, index de pulsativité, index de résistance). Les analyses ont été faites tous les 4 jours à partir de J10 de gestation. Les flux utero placentaires ont également été évalués. L'évolution de ces index au cours de la gestation montrait que les pics systoliques et les flux

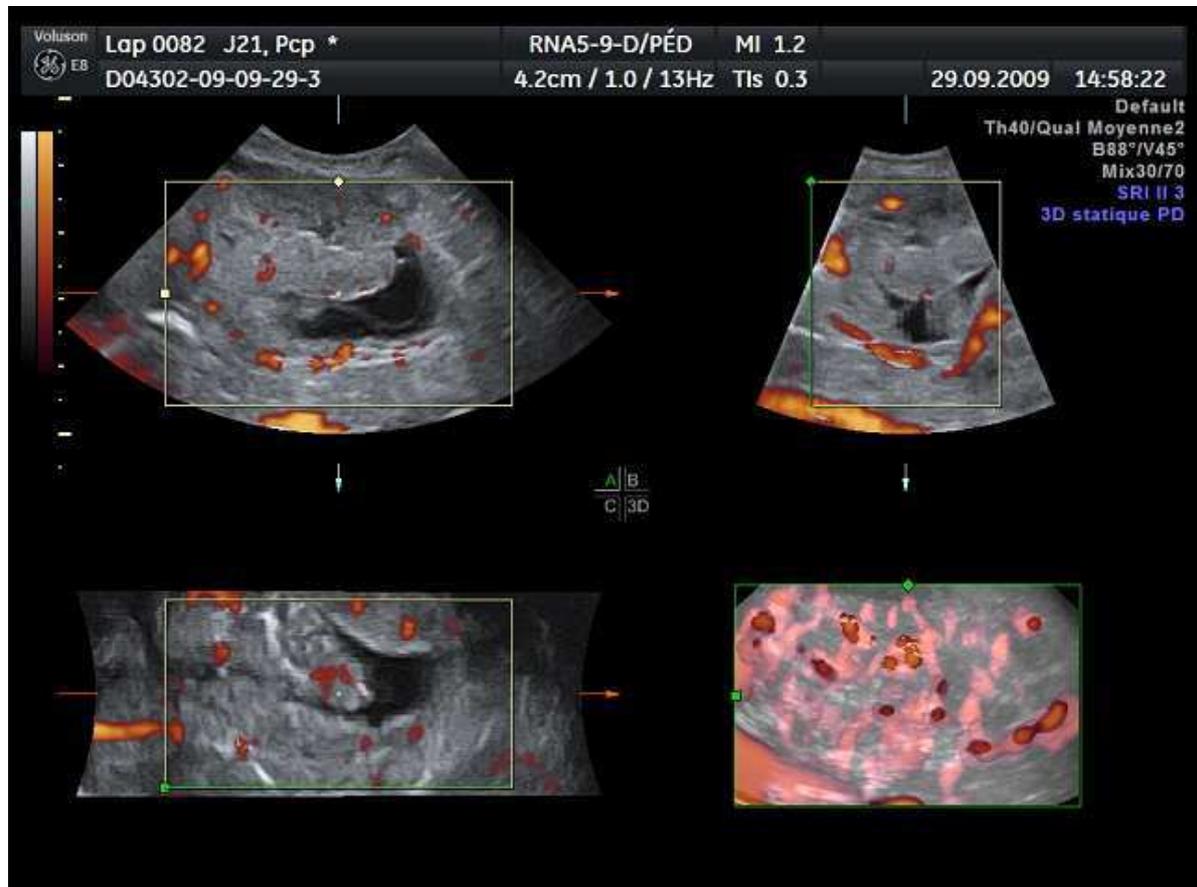


Photo 13. Acquisition en mode Triplan Angio 3D du placenta de lapin à J21.

diastoliques augmentaient au niveau utérin et ombilical alors que les indices de résistance et de pulsatilité diminuaient pour les vaisseaux fœtaux alors qu'ils étaient stables au niveau utero placentaire. Ces éléments n'ont pas été étudiés au cours de notre travail. En effet, les sondes utilisées sont des sondes adaptées à la femme, de grande taille et lourdes. Les sondes telles que celles utilisées par Polisca n'étaient pas disponibles. Nous nous sommes donc focalisés sur les biométries plutôt que sur les flux en mode Doppler. Il serait néanmoins intéressant de faire ce travail au sein de notre population d'étude de façon à voir si le retard de croissance intra utérin est associé à des anomalies des Doppler comme c'est le cas lors des retards de croissance intra utérin d'origine vasculaire chez la femme. Des travaux sur l'analyse de la vascularisation du placenta de lapin en mode 3D vasculaire sont en cours de mise au point au laboratoire (Photo 13. Thèse O. Morel, M2 E. Lecarpentier).

Chez la femme, il a été démontré que les niveaux plasmatiques de leptine sont corrélés avec l'existence d'un retard de croissance foetal<sup>168</sup>. A la naissance, les niveaux de leptine maternels sont plus faibles chez les enfants avec RCIU comparés aux enfants de poids normal<sup>168</sup>. Or, l'excès d'acide linoléique du régime maternel peut induire une réduction du taux de leptine de la descendance comme décrit chez le rat<sup>169</sup>.



#### **5.4. Effet du régime sur la croissance post natale**

Au sein des lapereaux nés avec RCIU dans l'expérience 1, une prise de poids rapide a été constatée menant à un rattrapage du poids des témoins au moment du sevrage. Or une croissance post natale rapide en terme de poids ou de taille, ou des deux, induit un syndrome métabolique chez l'animal<sup>170-172</sup>, mais aussi dans l'espèce humaine<sup>173-176</sup>. Jaquet et al.<sup>177</sup> ont montré chez l'homme que la rapidité de cette croissance post natale est corrélée avec le développement de maladies métaboliques qui apparaissent dès l'âge de 22 ans. Même s'il n'y avait pas d'excès de poids à l'âge de 6 ans, il existait une plus grande adiposité chez les anciens nouveaux nés hypotrophes<sup>178, 179</sup>. L'étude du rattrapage post natal du poids d'une cohorte d'enfants nés avec un retard de croissance a montré que le rattrapage post natal permettait une normalisation du poids à l'âge de un an sans modification de la résistance à l'insuline mais avec un taux de leptine plus élevé, ce qui n'excluait pas des conséquences délétères à long terme<sup>180</sup>. Dans l'avenir les interventions pédiatriques devront se baser sur la gestion de cette prise de poids, en sachant que le moment et la méthode idéale ne sont pas encore connus, la fenêtre idéale ne devant être ni trop précoce, en étant particulièrement prudent avant l'âge de un an<sup>180</sup>, ni trop tardive (avant la puberté)<sup>179</sup>.

Les lapins adultes nés de mères nourries par le régime HH avant et pendant la gestation étaient plus gros et mangeaient plus (expérience 1). Il est difficile de dire s'ils étaient plus gros parce qu'ils avaient plus d'appétit ou si parce que la programmation métabolique d'excès de poids induisait de plus grands besoins. Dans une étude épidémiologique humaine (Famine Hollandaise), les taux moyens d'énergie absorbée, les proportions de protéines et de glucides n'étaient pas différents entre les groupes exposés et non exposés.



Cependant, les personnes exposées à la famine en début de grossesse étaient plus sujettes à avoir un régime plus riche en lipides que les autres groupes. Il s'agissait de la première preuve chez l'humain que la nutrition prénatale pouvait affecter les préférences alimentaires, qui pouvaient elles mêmes induire un profil « athérogénique » à l'âge adulte<sup>27</sup>. Comme vu plus haut Howie et al. ont montré également que le régime alimentaire pendant la gestation « programmait » l'obésité de l'adulte quelle que soit l'alimentation post natale<sup>32</sup>. Jungheim et al. ont retrouvé des résultats similaires aux nôtres. Cette équipe a utilisé un régime hyperlipidique chez la souris. En cas de gestation, il existait un retard de croissance et un excès d'ARNm de Igf2r au niveau du placenta. Les descendants montraient ensuite une prise excessive de poids associée à une intolérance au glucose, une hypercholestérolémie et un excès d'adiposité à l'âge de 13 semaines<sup>181</sup>.

Il faut noter que les poids de naissance des lapereaux témoins de l'expérience 1 et de l'expérience 2 ne sont pas identiques alors que les tailles de portées sont comparables. Plusieurs explications peuvent être données. Tout d'abord un effet saisonnier : lors de la première expérience, la mise bas a eu lieu au printemps. Dans l'expérience 2, celle-ci a eu lieu en automne. Bien que les conditions de température et de lumière soient régulées, il n'est pas exclu que des écarts aient eu un impact expliquant la différence entre les deux groupes. Ensuite, l'épidémie de myxomatose qui est survenue au cours de l'expérience 2 a induit une forte mortalité dans la lapinerie. Il n'est pas exclu que les lapines mortes dans les deux groupes soient les plus faibles, avec des lapereaux de plus petits poids. Cependant, aucune différence de mesure n'avait été observée à l'échographie dans les deux groupes. Il est possible que cela n'ait joué que sur la prise de poids de fin de gestation.

Il existe donc bien des arguments expérimentaux et épidémiologiques faisant le lien entre un régime maternel inadapté pendant la gestation et une obésité à l'âge adulte de la descendance.



### **5.5. Effets du régime sur la tension artérielle à l'âge adulte**

Les tensions artérielles de nos lapins étaient globalement élevées, à la fois dans les groupes HH et dans le groupe contrôle et encore plus élevées chez les lapins HH. En effet, au repos, la pression artérielle moyenne était aux environ 10mmHg dans notre étude alors que cette pression est aux environs de 7,5mmHg pour Denton et al.<sup>145</sup>. Ceci suggère un stress des animaux par la procédure. En effet, Denton et al. ont mesuré la pression artérielle après 30 minutes de stabilisation, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Au vu du nombre de lapins à analyser et en raison du fait que nous n'avions qu'un seul appareil de mesure, il était impossible d'attendre un tel délai et nous avons attendu jusqu'à une stabilisation des courbes de pression, soit quelques minutes seulement. De plus, Denton et al. réalisaient une moyenne sur 15 minutes, ce qui n'est pas le cas chez nous. La prise de tension artérielle dans notre étude peut ainsi être source de biais. En effet, le délai entre la pose du cathéter et la mesure de la tension artérielle est très court (moins de 5 minutes). Il existe donc certainement un effet du stress lié à cette pose dans les mesures effectuées. Comme les conditions expérimentales étaient identiques pour tous les lapins, les résultats restent comparables. Cependant nos résultats de tension artérielle ne sont pas comparables à d'autres études dans lesquelles le délai est plus long ou alors pour lesquelles une autre méthodologie a été effectuée.



Dans l'avenir, il faudra prendre soin d'augmenter le délai entre la pose de cathéter et la prise de tension, de manière à analyser des animaux non stressés. Le laboratoire est en train d'acquiescer un système de mesure par télémétrie. Ce système permet de mesurer la tension artérielle du lapin à distance : une fois le capteur posé, le lapin est laissé dans sa cage sans contention ni manipulation, diminuant le stress infligé à l'animal.

Malgré ces limites méthodologiques, la tension artérielle moyenne est plus élevée chez les lapins issus du groupe HH. Cette observation peut suggérer une réponse au stress plus importante et non une augmentation de la tension artérielle de base. Ceci a déjà été observé par O'Regan et al., en 2008 chez le rat: l'injection de dexaméthasone in utero induisait une diminution de la tension artérielle de base mais une augmentation de la tension artérielle en cas de stress plus importante que chez les témoins<sup>182</sup>. K. Denton et al. ont montré que les lapereaux nés de mères hypertendues étaient plus à risque d'être eux aussi hypertendus, bien que cela concernait essentiellement les femelles et que les mâles semblaient « protégés »<sup>145</sup>. Dans notre étude, la différence de poids et la différence de tension artérielle qui existaient à l'âge adulte malgré un régime standard depuis le sevrage ont disparu après réintroduction du régime HH, suggérant une « protection » (Réponse Adaptative Prédictive, RAP) programmée dès la vie fœtale comme proposé par d'autres auteurs<sup>31, 183</sup>.

## **5.6. Effets du régime sur l'athérosclérose**

Des lésions macroscopiques aortiques d'athérosclérose ont été vues chez les mères sous régime HH de l'expérience 1, qui ont eu l'exposition au régime la plus longue. Ces lésions n'ont pas été observées chez les mères sous régime HH de l'expérience 2. Ce résultat semblerait logique, au vu des durées d'exposition au régime HH. Cependant, si on suppose un mécanisme inflammatoire surajouté créant des lésions à leurs lapereaux du fait de l'épidémie, celle-ci n'a pas eu les mêmes conséquences chez les mères.



Aucune lésion athérosclérotique n'a été observée au moment du sevrage chez les lapereaux de l'expérience 1. Par contre des lésions ont été retrouvées au sein des lapereaux de l'expérience 2. De telles lésions ont déjà été décrites chez de jeunes hommes adultes et même chez des enfants. Les lésions les plus précoces peuvent même être retrouvées dans certaines artères fœtales et l'hypercholestérolémie maternelle, même temporaire, pendant la grossesse accroît le nombre et la taille de ces lésions<sup>139; 184</sup>. Etant donné que les lésions aortiques sont corrélées à l'hypercholestérolémie, il semble logique que ces lésions régressent ensuite pendant l'enfance car les taux de cholestérol sont plus faibles. Ceci peut-être expliqué par l'induction d'un état où des gènes « athérogènes » surexprimés dans les parois vasculaires des vaisseaux fœtaux secondairement à l'hypercholestérolémie maternelle ou aux lésions précoces. Napoli et al.<sup>184</sup> ont proposé que de tels gènes existeraient et seraient activés par l'hypercholestérolémie ou un processus se mettant en place pendant la formation des lésions aortiques secondaires à l'hypercholestérolémie. Les études chez le lapin démontrent que l'augmentation de ces lésions, identiques à celles vues chez le fœtus humain, est associée à l'hypercholestérolémie et sont indépendantes des facteurs génétiques parentaux<sup>184</sup>.

Hansson et al. ont démontré que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire<sup>63</sup>. Or cette composante n'a pas été étudiée dans nos populations de lapins. Il est possible que la nutrition ait un impact sur l'immunité et la réponse inflammatoire, qui fait qu'un groupe de lapin va développer des plaques et l'autre non. Il serait donc intéressant d'évaluer la réponse inflammatoire, l'état oxydatif et les populations lymphocytaires dans les deux groupes. Ainsi il a été montré chez la souris que des antigènes présents dans les plaques entraînent l'activation de lymphocytes T et contribuent à la formation de l'athérosclérose<sup>63</sup>.

Yamashita et al. ont démontré que le fait d'immuniser la mère avec des anticorps anti LDL oxydés diminuait le risque que le conceptus développe des lésions d'athérosclérose<sup>64</sup>. Ainsi, Palinski et al. vont jusqu'à émettre l'hypothèse qu'il serait possible de programmer la réponse immunitaire post natale afin de diminuer l'athérosclérose<sup>65</sup>.



Dans notre étude aucune lésion athérosclérotique n'a été retrouvée chez les lapereaux de mère sous régime HH de l'expérience 1. Cependant, des lésions d'athérosclérose ont été retrouvées chez des lapereaux de mère sous régime HH de l'expérience 2. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cela. La première hypothèse est liée au moment auquel a débuté le régime. On peut supposer que pour l'ovocyte, le fait d'être soumis à un environnement athérogène va préparer l'embryon ou le fœtus qui va ainsi développer des mécanismes de protection contre le développement de l'athérosclérose. Ceci serait compatible avec la théorie du phénotype économe<sup>31</sup>. Nous n'avons aucun élément scientifique à ce jour pour prouver cette hypothèse. La deuxième hypothèse est environnementale. En effet, il faut noter qu'au cours de la deuxième expérience est survenue une épidémie de myxomatose au sein de la lapinerie. Si les animaux malades n'ont pas été utilisés, il est donc possible que dans ce groupe un facteur inflammatoire lié à une infection non symptomatique se surajoute à l'hypercholestérolémie et favorise la survenue des lésions aortiques.

Une source de biais dans notre étude concerne le sexe des lapereaux. En effet, nous avons bien évidemment équilibré les portées à la naissance pour que chaque mère ait un nombre identique de lapereaux à nourrir. Du fait de la mortalité élevée dans l'expérience 1, ces équilibrages de portées ont été faits quasi quotidiennement. Il n'est pas exclu que ces changements aient un impact sur les lapereaux. En toute rigueur il aurait également fallu équilibrer les portées en fonction du sexe et faire les statistiques en différenciant males et femelles. Cela n'a pas été fait pour plusieurs raisons : il n'y a pas eu de sexage à la naissance, mais plus tard, au moment du sevrage. Ce sexage est difficile et peu d'expérimentateurs savaient le faire à la naissance. Par la suite, en raison des sous groupes et de la mortalité induite par les abattages pour autopsie et les morts spontanées, les effectifs étaient trop petits pour faire une analyse statistique. A l'avenir, le sexe des lapereaux devra être déterminé précocément. Ceci est d'ailleurs déjà le cas pour les protocoles actuellement en cours.

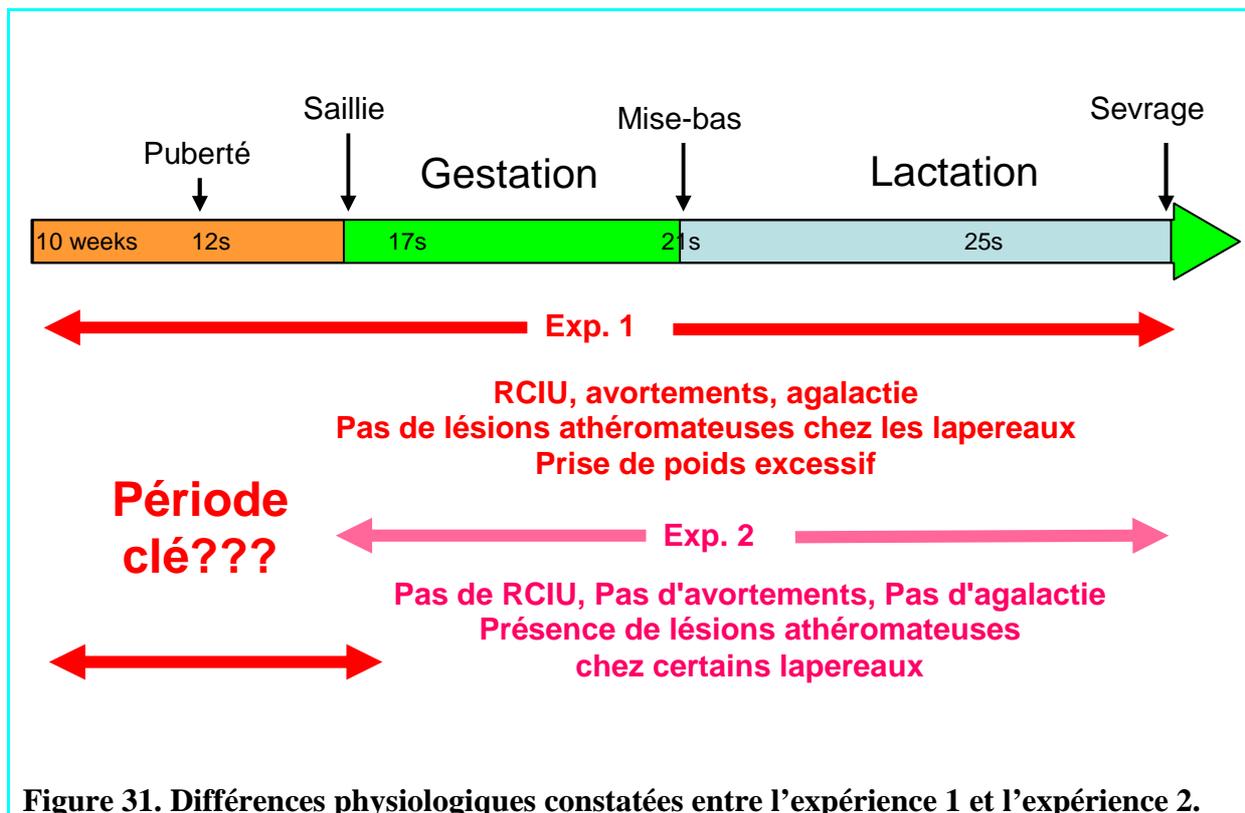


Figure 31. Différences physiologiques constatées entre l'expérience 1 et l'expérience 2.

## **6. Expression de l'Adipophiline**

### **6.1. Analyse transcriptomique par la puce ADNc dédiée et qRT-PCR**

Les résultats de qRT-PCR confirment ce qui était montré par l'analyse transcriptomique: une plus grande quantité de transcrite de l'Adipophiline au sein des embryons issus de mères HH que dans les embryons issus de mère C à 48h PC. Les embryons analysés au stade 48h PC provenaient de 6 femelles différentes et étaient rassemblés afin de faire des lots de 10 embryons. Il est donc possible qu'il existait une forte expression de transcrits d'adipophiline dans un faible nombre d'embryons induisant une grande variabilité de l'expression observée dans le groupe C. A l'opposé, les pools d'embryons HH, recueillis et manipulés de la même façon montraient une variabilité bien moindre, résultant d'un plus grand nombre d'embryons à forte expression de transcrite d'adipophiline ou à une population d'embryons moins hétérogènes exprimant tous un niveau moyen de transcrite d'adipophiline. Afin de répondre à cette question, il faudrait pouvoir analyser les embryons de façon individuelle. Ceci n'a pu être réalisé car la quantification que nous avons mise au point n'est pas assez sensible pour diminuer d'un facteur 10 la quantité de transcrite de l'échantillon.

Cette surexpression est provisoire puisqu'il n'existe plus la même différence au stade blastocyste (J5,5). Au contraire, on trouve une sous expression de transcrite d'adipophiline à ce stade plus tardif, comme si l'embryon précoce exposé à un environnement hyperlipidique se préparait à devoir capter et stocker des lipides et que ce stock effectué, la transcription diminuait par une sorte de rétrocontrôle négatif.



Contrairement aux fœtus qui ont été suivis en échographie et en post natal dans notre étude, les embryons utilisés pour l'analyse transcriptomique ont été recueillis après stimulation ovarienne et non après ovulation naturelle. On ne peut donc pas exclure formellement un impact de cette stimulation hormonale. Toutefois, les embryons issus des deux régimes HH et C ont été recueillis après un protocole de stimulation identique : s'il y avait eu un effet lié à cette hyperstimulation il devrait donc être identique dans les deux groupes.

Notre travail démontre donc qu'un régime hyperlipidique hypercholestérolémique peut affecter l'expression génique embryonnaire à un stade très précoce, dès la période de mise en route du génome.

L'expression de l'adipophiline n'a jamais encore été étudiée sur des embryons à un stade aussi précoce. L'Adipophiline est une protéine de 50 kDa qui a d'abord été clonée à partir d'une bibliothèque d'ADNc d'adipocyte de souris<sup>185</sup> pour laquelle il existe une grande homologie inter-espèce de cette protéine. La protéine Adipophiline se localise à la surface des gouttelettes lipidiques neutres dans les adipocytes et dans une vaste gamme de cellules et de tissus qui stockent ou synthétisent des lipides. Cette protéine qui appartient à la famille de la Périlipine (famille PAT : Perilipin Adipophiline TIP47). Les membres de cette famille jouent un rôle majeur dans le contrôle du stockage et de l'utilisation des triglycérides.

La présence de gouttelettes lipidiques est considérée comme jouant un rôle important dans le stockage d'énergie dès la période de maturation ovocytaire et ensuite au moment de la fécondation et du développement embryonnaire précoce. Il a également été montré que leur nombre et leur taille sont influencés par l'environnement. En particulier, l'environnement *in vitro* versus *in vivo*<sup>186</sup> et l'addition de sérum à l'environnement *in vitro*<sup>187</sup> sont connus pour avoir un impact sur les gouttelettes lipidiques. De façon très intéressante, l'analyse protéique des gouttelettes lipidiques au sein des embryons de drosophile montre leur implication dans la séquestration de protéines d'origine maternelles pendant la transition materno-embryonnaire

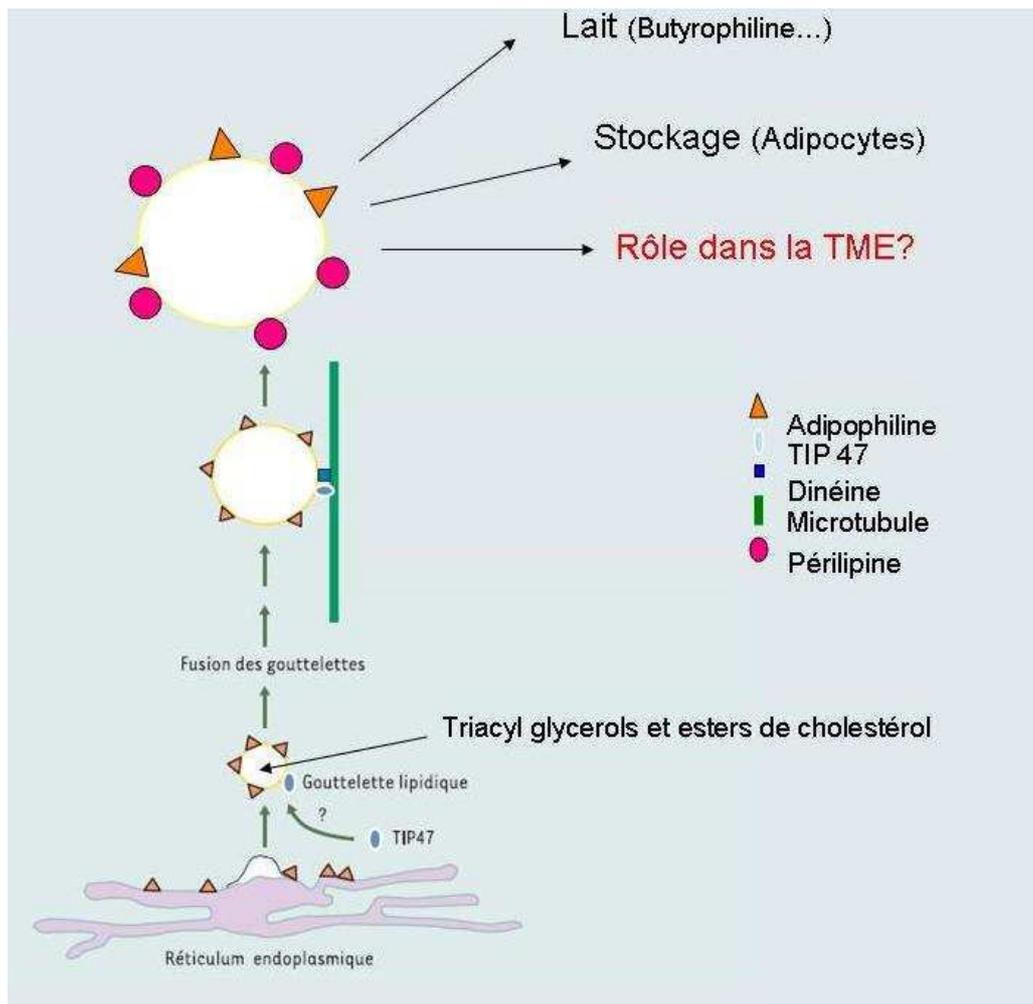


jusqu'à ce qu'elles soient utilisées par l'embryon. Parmi ces protéines, des histones maternelles sont séquestrées dans les gouttelettes pendant l'ovogénèse et progressivement transférées vers le noyau au cours du développement embryonnaire<sup>188</sup>. Étant donné qu'il existe une conservation de fonction des protéines constitutives des gouttelettes lipidiques entre la drosophile et les mammifères<sup>189</sup>, on peut faire l'hypothèse que la fonction des gouttelettes lipidiques est conservée. Si cette hypothèse est vraie, alors les modifications dans les quantités d'Adipophiline pourraient avoir un impact sur les protéines d'origine maternelle et en particulier sur le stockage des histones et leur libération pour une utilisation ultérieure.

Le régime maternel durant la période pré-implantatoire agirait comme un signal pour le jeune embryon afin qu'il régule son propre développement. Des perturbations au stade pré-implantatoire ont été rapportées comme pouvant induire une obésité<sup>164</sup> et une hypertension<sup>38</sup> dans la descendance.

## **6.2. Immunofluorescence indirecte**

Les marquages réalisés sur les embryons montrent que les gouttelettes lipidiques sont présentes en plus grande quantité dans les embryons HH que dans les témoins dès J2 et qu'elles se localisent ensuite autour des noyaux des cellules du trophoctoderme (stade blastocyste : J5,5). Ceci montre bien le stockage lipidique au sein de ces embryons issus de mère ayant reçu le régime hyperlipidique hypercholestérolémique. La quantification de la protéine n'a pas été effectuée car nous n'avons pas réussi à mettre au point un western blot : la protéine libre est très instable dans le cytoplasme et plusieurs auteurs ont eu les mêmes difficultés. L'Adipophiline qui n'est pas liée à des gouttelettes lipidiques est dégradée dans des protéasomes<sup>190, 191, 192, 193</sup>. Dans notre expérience, le fait que l'on mette en évidence plus de protéines par immunofluorescence et moins d'ARNm par qRT-PCR au sein des blastocystes soumis à un environnement HH peut être due à une stabilisation des protéines qui sont dans



**Figure 32. Formation des gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique.**

Une fois formées, l'utilisation des gouttelles va varier en fonction du tissu dans lequel elles se forment : stockage pour les adipocytes, ou dans la formation du lait pour la glande mammaire....

les membranes des gouttelettes lipidiques et donc moins dégradées par les protéasomes et un rétrocontrôle négatif qui diminue la transcription. Une solution serait de mettre les embryons en culture et de bloquer cette dégradation par du MG132 (protéine inhibant les protéasomes) comme proposé par Orlicky et al.<sup>190</sup>. Cependant cette mise en culture induirait des biais qui nous éloigneraient des conditions physiologiques et des événements observés *in vivo*.

Comme vu un peu plus haut, chez la drosophile, les histones maternels sont séquestrés dans des gouttelettes lipidiques pendant l'ovogénèse et progressivement transférés vers le noyau au cours du développement embryonnaire<sup>188</sup>. Cette observation est cohérente avec celle que nous constatons puisque nous pouvons remarquer la localisation des gouttelettes plus proches du noyau dans le groupe HH. Ce phénomène doit bien évidemment avoir lieu dans les embryons du groupe contrôle, mais en bien moindre importance du fait de la plus faible quantité de gouttelettes et est donc moins visible. Ceci alors même que le décalage de l'expression temporelle de l'adipophiline entraîne une diminution de la quantité de transcrits à ce stade.

### **6.3. Formation des gouttelettes lipidiques**

En raison de la présence de l'Adipophiline et de nombreuses gouttelettes lipidiques, il me semble important de faire un rappel sur la formation de gouttelettes lipidiques (**Figure 32**).

A partir des données biochimiques et morphologiques obtenues principalement chez la levure et les plantes, un modèle dominant de la formation de gouttelettes lipidiques a émergé. Selon ce modèle, les lipides neutres sont synthétisés dans les feuillettes de la bicouche membranaire du réticulum endoplasmique (RE): les lipides neutres s'accumulent entre la membrane luminale et la membrane cytoplasmique de la bicouche phospholipidique. La majorité des preuves à l'appui de ce modèle est dérivée des expériences utilisant la microscopie électronique<sup>194-196</sup>. Comme les lipides neutres s'accumulent et s'agrègent, la bicouche se distend localement sous forme d'un bourgeon de lipides neutres entouré d'une monocouche de



phospholipides. Finalement, ces bourgeons se détachent dans le cytosol formant des gouttelettes lipidiques naissantes ou restent associés au RE. Dans de nombreuses études, il apparaît que les gouttelettes lipidiques se trouvent non seulement au niveau des membranes du réticulum endoplasmique, mais aussi à proximité des mitochondries et des péroxysomes<sup>194, 197</sup>. Les protéines PAT sont probablement sous forme de complexes préformés dans lesquels les lipides neutres nouvellement synthétisés sont transférés. Les protéines de l'enveloppe se fixent à la surface des agrégats de lipides par des séquences peptidiques spécifiques ou par des interactions hydrophobes. Pendant la première heure de la synthèse accélérée de TAG, les gouttelettes lipidiques associées à S3-12 restent séparées des gouttelettes associées à la périlipine qui sont dans la zone péri-nucléaire. Toutefois, après des périodes de traitement plus longues, les gouttelettes lipidiques associées à S3-12 deviennent plus grandes et se rapprochent du noyau. L'allongement des temps de traitement se traduit également par un anneau de gouttelettes situé entre la périphérie des gouttelettes lipidiques associées à S3-12 et les gouttelettes lipidiques associées à la Périlipine et qui sont recouvertes avec les deux protéines. La composition des protéines manteau de gouttelettes lipidiques change pendant que les gouttelettes lipidiques s'agrandissent et mûrissent. S3-12 et TIP47 se retrouvent autour de minuscules dépôts de lipides neutres en périphérie des adipocytes<sup>198, 199</sup>. Quand ces gouttelettes croissent, elles migrent vers le centre des adipocytes et acquièrent l'Adipophiline tout en perdant progressivement TIP47<sup>199</sup>. Comme les gouttelettes s'agrandissent encore, Périlipine remplace d'autres protéines du manteau de gouttelettes lipidiques. Les plus importantes gouttelettes lipidiques sont recouvertes seulement de Périlipine<sup>199</sup>. Enfin, lorsque les adipocytes sont éloignés des conditions qui favorisent la synthèse de TAG, S3-12 revient à sa distribution plus diffuse, laissant la Périlipine seule à la surface des gouttelettes lipidiques<sup>198</sup>. Il existe donc un ordonnancement spatial et temporel du processus de formation des gouttelettes lipidiques. La maturation des gouttelettes implique la coordination de



redistribution des protéines PAT. Il existe également des réserves préexistantes de protéines PAT avant le chargement du substrat des adipocytes. Ces pools de protéines contribuent probablement à la capacité des adipocytes à effectuer la synthèse rapide des TAG.

Il peut également y avoir un remodelage des gouttelettes lipidiques des adipocytes en réponse à la stimulation des adipocytes par des  $\beta$ -agonistes adrénergiques<sup>200-203</sup>, un petit nombre de grandes gouttelettes lipidiques se fragmente en une multitude de minuscules gouttelettes microlipidiques qui se dispersent dans tout le cytoplasme. Périlipine A entre en concurrence avec Adipophiline pour la liaison à des gouttelettes lipidiques et est plus efficace pour atténuer la lipolyse que l'Adipophiline. Néanmoins, des études similaires ont montré que la surexpression d'Adipophiline dans une variété de cellules en culture augmente également le stockage triacylglycérol<sup>204-208</sup>. Ces études montrent que l'Adipophiline, comme la Périlipine A, accumulent les triacylglycérols et les protègent de l'activité des lipases cytosolique.

Le mouvement observé et le remodelage dynamique des gouttelettes lipidiques suggèrent que bien que des gouttelettes lipidiques sont incluses dans la membrane du réticulum endoplasmique, elles en sont expulsées pour devenir des structures distinctes. Le contact transitoire de gouttelettes lipidiques matures avec d'autres organites a été suggéré par des études montrant le contact des gouttelettes lipidiques avec des péroxysomes chez la levure<sup>209</sup> et peut permettre de déplacer des lipides et des protéines entre les gouttelettes de lipides et d'autres compartiments : les gouttelettes de lipides des cellules de mammifères, ainsi que des embryons de drosophile, se déplacent le long des microtubules en utilisant la dinéine<sup>210-212</sup>.



#### **6.4. *Adipophiline dans le Trophoblaste et Placenta***

Au sein des blastocystes, les zones dans lesquelles les modifications entraînées par le régime HH étaient les plus flagrantes étaient situées dans le trophoctoderme. Or cette structure embryonnaire va ensuite donner le placenta. La fourniture de nutriments par la mère est obligatoire pour le développement intra-utérin du fœtus et sa croissance. Parmi les éléments nutritifs essentiels, les lipides venant de lipoprotéines sont utilisés comme substrats pour la croissance du fœtus, comme source d'énergie, et comme précurseurs de la synthèse des hormones stéroïdiennes. Les nutriments sont transportés de la circulation maternelle vers la circulation fœtale à travers le trophoblaste villositaire. Bien que les triglycérides ne passent pas directement à travers la barrière placentaire<sup>68</sup>, la présence d'une lipoprotéine lipase dans les cellules trophoblastiques permet l'hydrolyse et l'absorption des triglycérides du plasma maternel<sup>213-215</sup>. En revanche, les acides gras peuvent traverser les membranes de surface du trophoblaste par simple diffusion et transport facilité, grâce à la médiation de protéines de transport membranaires et cytosoliques<sup>72, 216, 217</sup>. L'absorption et le transfert transplacentaire des acides gras sont essentiels pour le développement du fœtus. Les récepteurs nucléaires peroxisome proliferator-activated receptor-(PPAR) stimulent l'absorption des lipides par les adipocytes et favorisent la différenciation du trophoblaste. Bildirici a montré que l'Adipophiline est exprimée au sein du trophoblaste villositaire humain et que cette expression d'Adipophiline est renforcée lors de la différenciation in vitro du trophoblaste humain primaire<sup>218</sup>. Il a également constaté que l'exposition du trophoblaste humain en culture avec le ligand de PPAR $\gamma$  (la troglitazone) a entraîné une augmentation concentration-dépendante de l'expression d'Adipophiline. Une semblable augmentation a été retrouvée avec LG268, un ligand de RXR, le partenaire hétérodimérique de PPAR $\gamma$ . Enfin, Bildirici et al. ont démontré que PPAR $\gamma$  et RXR activés par leurs ligands stimulaient l'activité transcriptionnelle du



promoteur de l'adipophiline dans les cellules CV-1 et dans la lignée de cellules placentaires JEG3. L'expression d'adipophiline est renforcée lors de la différenciation du trophoblaste et est stimulée par PPAR et RXR. L'augmentation de l'expression de l'adipophiline peut contribuer à la fixation des acides gras par le placenta<sup>218</sup>. L'expression de l'Adipophiline, est régulée par des acides gras dans la lignée cellulaire BEWO placentaire et dans le primaire trophoblaste humain. Cette régulation est spécifique à certains acides gras polyinsaturés à longue chaîne (LCPUFAs) tels que AA, l'EPA et DHA. Tobin a déjà montré une capture préférentielle dans les cellules des LCPUFAs dans les cellules BEWO. Ces LCPUFAs se sont révélés être préférentiellement transportés de la circulation maternelle par le placenta vers le fœtus<sup>219</sup>. Les effets des acides gras sur l'ARNm de l'adipophiline sont largement similaires à ceux observés pour les niveaux de protéines Adipophiline. En revanche, les effets différentiels de l'ARNm et de la protéine Adipophiline ont été observés après la stimulation par des agonistes synthétiques de PPAR et RXR. En particulier l'agoniste PPAR $\delta$  augmente l'ARNm de l'adipophiline dans les cellules BEWO, alors qu'il n'y avait pas d'augmentation de la protéine Adipophiline après un traitement de cellules BEWO avec des ligands synthétiques pendant 24 h. Cela pourrait être attribuable à une réponse différente dans le temps de l'expression de la protéine Adipophiline après stimulation par des ligands synthétiques par rapport aux acides gras, ou à une traduction minimale, ou à un niveau plus élevé de dégradation des protéines.

Les résultats de Tobin<sup>220</sup> indiquent que les agonistes synthétiques de PPAR et RXR sont capables d'induire l'augmentation du niveau d'ARNm de l'adipophiline sans nécessairement augmenter la quantité de lipides dans les cellules. Sans lipide, la protéine Adipophiline ne serait pas stabilisée et soumise à dégradation. Nous avons retrouvé une réponse comparable au stade blastocyste avec une sous expression d'ARNm et visiblement une augmentation de la présence de la protéine en immunohistochimie.



Contrairement aux adipocytes, le trophoblaste n'est pas constitué de cellules qui accumulent des lipides. Par conséquent, le rôle de l'Adipophiline dans le trophoblaste pourrait être différent de son rôle dans d'autres types cellulaires. Les données de Tobin sont conformes aux rapports récents qui montrent une absorption accrue des LCPUFAs, mais pas des acides gras à chaîne courte dans les cellules COS-7 lorsque l'Adipophiline est surexprimé<sup>204</sup>. Ces LCPUFAs sont préférentiellement transportés par le placenta et sont essentiels pour la croissance du fœtus et du développement<sup>219, 221, 222</sup>. En outre, dans les macrophages, la stimulation de l'expression de l'Adipophiline promeut le stockage des triglycérides et du cholestérol<sup>206</sup>.



## **H. Conclusions**



Nous avons démontré que le régime hyperlipidique hypercholestérolémique débuté avant la conception induit :

- Chez les mères :
  - une hyperlipidémie et une hypercholestérolémie sans obésité
  - de l'athérosclérose
- Chez les embryons :
  - Une perturbation de l'expression de gènes au moment de l'activation de la transcription embryonnaire. L'adipophiline, impliquée dans le métabolisme lipidique est sur exprimé à J2, sous exprimé à J5.
  - Une accumulation de goutellettes lipidiques au niveau du trophoctoderme
- Chez les fœtus
  - Un retard de croissance intra utérin précoce
  - Une diminution de l'adiposité
  - Une inversion du rapport poids fœtal/ poids placenta
- A la naissance :
  - Un petit poids de naissance
- Au sevrage :
  - Une hypertriglycémie et une hypercholestérolémie chez les lapereaux  
HH-HH
  - Un rattrapage pondéral post natal rapide indépendant de l'aliment maternel
- Chez l'adulte :
  - Un surpoids
  - De l'hypertension artérielle



Le régime débuté au moment de la mise à la reproduction ne retrouve pas les perturbations physiologiques décrites quand le régime est débuté avant la conception. Cependant les lapereaux ont eu tendance à développer de l'athérosclérose.

Les résultats présentés ici illustrent l'importance de la nutrition maternelle pendant la période préconceptionnelle et pendant la gestation pour la croissance du conceptus in utero mais aussi jusqu'à l'âge adulte et pour le développement de maladies à long terme.



# **I. Perspectives**



Le travail réalisé pour cette Thèse met en évidence l'importance de la nutrition durant la période préconceptionnelle et pendant la gestation. Le modèle expérimental que nous avons développé est déjà à la base de plusieurs travaux, et les perspectives de recherche sont également nombreuses. Je vais présenter ici les principaux axes qui pourraient être développés.

*Digestion chez la lapine :*

La particularité de la digestion chez la lapine qu'est la caecotrophie mériterait d'être mieux explorée. En effet nous n'avons pas analysé la composition en lipides des caecotrophes ni des selles dures des lapines. On ne connaît donc pas quelle est l'absorption lipidique réelle ni à quel moment elle se produit, et si la ré-ingestion des caecotrophes joue un rôle dans cette absorption.

*Modification de l'expression du génome embryonnaire :*

Le fait que le génome du lapin soit désormais complètement séquencé et que l'extension du réseau dédié 30 000 gènes sera bientôt réalisée permettra d'aller plus loin dans l'analyse des modifications de l'expression des gènes au stade de la mise en route du génome. Cela permettra également de cibler des gènes du métabolisme lipidique absent du premier réseau utilisé. Maintenant que nous avons montré que l'expression de l'adipophiline est modifiée, une autre approche serait celle d'analyser des gènes candidats, dont les protéines pourraient également intervenir dans le métabolisme lipidique. L'expression du gène codant pour l'HMG Co A reductase, gène essentiel de la synthèse du cholestérol serait intéressant à étudier, d'autant que ce gène est absent du réseau utilisé au cours de cette thèse.



### *Rôle des Mâles :*

Il serait intéressant d'évaluer la part du père dans les phénomènes observés. Il pourrait être proposé de donner un régime HH ou C à des mâles et de leur faire féconder des femelles soit C soit HH pour voir l'impact sur le développement fœtal.

Enfin les spermogrammes des mâles sous régime sont en cours d'analyse, les recueils ayant déjà été effectués.

### *Impact du régime sur l'ovaire et les ovocytes :*

Nous avons pointé dans cette thèse le rôle de la période préconceptionnelle. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'analyser les effets du régime sur l'ovogenèse et sur l'expression de gènes ovocytaires. Au cours de cette thèse, j'ai recueilli de nombreux ovocytes au stade précoce et au stade M2 d'embryons tout venant et des régimes HH et C qui vont servir à l'établissement d'un réseau. Ce réseau pourra être utilisé pour analyser les différences d'expressions géniques entre différentes conditions expérimentales. L'analyse des modifications épigénétiques ovocytaires devrait également être réalisée.

### *Impact du régime sur l'embryon :*

Il a été démontré dans le laboratoire que des milieux de culture pouvaient avoir un impact sur l'expression de certains gènes. Il serait donc intéressant de mettre en place une étude in vitro en cultivant des embryons dans des milieux différemment enrichis en lipides.

Une analyse des modifications épigénétiques embryonnaires pourrait également donner des informations importantes concernant la mécanistique expliquant les phénomènes observés.



### *Athérogénèse :*

Nous avons mis en évidence une réponse différente par rapport à l'athérogénèse. Il serait intéressant d'aller plus loin dans l'analyse de l'inflammation qui joue un rôle fondamental dans la genèse des plaques d'athérosclérose. On peut aussi envisager de recommencer l'expérience 1 mais en ajoutant des antioxydants, se rapprochant de l'étude Montoudis et al<sup>81</sup> qui a montré que cela pouvait diminuer l'impact du régime sur l'athérosclérose. Sur le même modèle il serait intéressant de voir si cela « normalise » l'expression de gènes embryonnaires perturbés et si la croissance fœtale et le poids de naissance sont modifiés.

### *Evaluation foetale*

L'analyse échographique (notamment Doppler) doit être poussée grâce aux améliorations technologiques récentes.

### *Conséquences transgénérationnelles :*

Les conséquences transgénérationnelles du régime avec le suivi de la gestation des descendants des lapines mises sous régime pendant la gestation pourraient nous donner des informations intéressantes. L'analyse des ovaires des lapereaux soumis in utero au régime HH de leur mère pourrait également être intéressante, la période fœtale étant le moment où se constitue le stock d'ovocytes primordiaux.



### *Transfert d'embryon :*

Des transferts d'embryons ont débuté: des embryons d'une mère HH seront recueillis et transférés dans l'utérus d'une mère C et réciproquement. Les conséquences physiologiques (croissance, ovaires) seront analysées. Il sera intéressant de voir si le fait d'implanter un embryon issu d'une mère recevant le régime HH depuis plusieurs semaines (protocole de l'expérience 1) sur une mère contrôle empêche la survenue d'un retard de croissance ou la survenue de l'obésité.

### *Alimentation hyperlipidique et infertilité :*

Le problème de l'infertilité ne fait pas strictement partie de la problématique abordée dans ce travail de thèse. Cependant cette thématique illustre un effet possible de l'environnement. Aux USA parmi les femmes entre 20 et 39 ans, 25% sont en surpoids (IMC entre 25 et 29.9), 28% sont obèses (IMC>30), et 6% ont une obésité morbide (IMC>40). Nous avons réalisé à une revue de la littérature illustrant les problèmes d'infertilité liés à l'alimentation et complétant ce qui est écrit ci-dessus (Annexe 2)<sup>223</sup>. Les dosages hormonaux à différents temps d'une expérience reprenant le protocole de l'expérience 1 ont été réalisés et sont en cours d'analyse. Il semblerait que des perturbations hormonales (décalage du pic de LH soient présents). Ces éléments donneront des indications sur les conséquences du régime en terme de fertilité (M2 AG Cordier).



*Lien avec la recherche clinique :*

Enfin, il est important de réfléchir à des études humaines permettant de faire le lien entre ce qui a été décrit dans ce travail fondamental et la pratique clinique. J'envisage de mettre en place une étude clinique dont l'objectif serait de faire le lien entre un bilan lipidique prescrit à plusieurs moments de la grossesse, les complications maternelles (hypertension, diabète), la croissance fœtale, le poids de naissance, l'analyse du placenta (poids, expression de gènes), et l'évolution du poids de l'enfant jusqu'à l'âge de un an. Par la suite il faudra évaluer si d'éventuels facteurs correctifs, diététiques ou médicamenteux peuvent apporter une amélioration.

En tant qu'obstétricien, confronté régulièrement à la prise en charge de patientes en surpoids ou avec une alimentation déséquilibrée, j'ai parfaitement conscience de la lutte qu'il faut mener, tant les conséquences en terme de santé publique sont importantes. Il est fondamental de commencer cette lutte avant que la patiente évoque un désir de grossesse. Elle comprendra l'intérêt pour elle même, mais aussi pour le futur cardio-vasculaire de son enfant. Le rôle du gynécologue obstétricien en terme de prévention est fondamental pour le déroulement de la grossesse en cours ou à venir mais aussi pour les générations à suivre.



# **Annexes**



# Annexe 1: Programmation fœtale des maladies de l'adulte : quelle importance pour la pratique obstétricale ?<sup>13</sup>

Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction 36 (2007) 338-343



ÉTAT DES CONNAISSANCES

## Origine fœtale des maladies de l'adulte : quelle importance pour la pratique obstétricale ?

## Developmental origin of human adult disease: which importance for obstetrical practice?

O. Picone<sup>a,\*</sup>, J.-L. Servely<sup>b</sup>, P. Chavatte-Palmer<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Service de gynécologie obstétrique, hôpital Antoine-Béclère, 157, rue de la Porte-de-Trivaux, 92141 Clamart, France

<sup>b</sup> Institut national de recherche agronomique (Inra-ENVA 1198), UMR biologie du développement et reproduction, domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

Reçu le 4 décembre 2006 ; avis du comité de lecture le 18 janvier 2007 ; définitivement accepté le 22 janvier 2007

Disponible sur internet le 26 février 2007

### MOTS CLÉS

Origines au cours du développement des maladies de l'adulte ;  
Programmation fœtale ;  
Nutrition Fœtale ;  
Glucocorticoïdes

**Résumé** Le concept de programmation fœtale correspond à l'induction par une perturbation du développement embryonnaire ou fœtal d'une prédisposition à développer des maladies métaboliques comme le diabète ou l'hypertension artérielle chez le même individu à l'âge adulte. Pour certains auteurs, des conséquences psychiques comme les troubles de la personnalité, ou la schizophrénie peuvent rentrer dans le même cadre. La sous-nutrition ou la surnutrition, l'administration maternelle de glucocorticoïdes ou une pathologie placentaire sont les facteurs de perturbation les plus communément associés à ces effets à long terme, qui peuvent être transmis sur plusieurs générations. La connaissance par le gynécologue-obstétricien de ces phénomènes est fondamentale afin de pouvoir insister auprès des patientes sur la prévention dans le cadre d'une prise en charge préconceptionnelle. De plus, les mécanismes mis en cause, qu'ils soient pathophysiologiques ou épigénétiques, sont encore mal connus et font l'objet de nombreuses recherches tant en physiologie qu'en génétique.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### KEYWORDS

Developmental Origin of Human Adult Disease (DOHAD);  
Foetal programming;  
Foetal nutrition;  
Glucocorticoids

**Abstract** The Developmental Origins of Human Adult Disease are thought to be secondary to a perturbation of the embryonic or fetal development, which leads to metabolic disorders such as diabetes or hypertension at adulthood. Maternal undernutrition or overnutrition, repeated glucocorticosteroids administered to the mother, or placental dysfunction are the most frequently considered causal factors. Therefore, it is necessary that the obstetrician is aware of these phenomena, as this knowledge may contribute to the prevention of adult diseases. Little is known yet, on the pathophysiological or epigenetic mechanisms that lead to these observations, and more studies are needed both in humans and animal models.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Olivier.picone@abc.aphp.fr (O. Picone).

## Introduction

Le lien existant entre le poids de naissance et le développement à l'âge adulte de maladies est un lien solide, en particulier pour les maladies coronariennes, le diabète et l'hypertension artérielle. Ce lien existerait aussi pour certains troubles psychiques comme des troubles de la personnalité ou la schizophrénie. L'hypothèse principale qui prévaut est la « programmation fœtale ». Celle-ci s'établirait lors du développement fœtal perturbé par un stimulus anormal qui induirait des phénomènes adaptatifs irréversibles. L'objectif de cette revue de la littérature est donc de faire le point sur les données actuelles qui ouvrent la route de la compréhension de ces mécanismes de « programmation fœtale ». En effet, la connaissance par le gynécologue-obstétricien de ce lien étroit entre ce qui se passe pendant la grossesse et ce qui en résultera à très long terme est fondamentale afin de pouvoir insister auprès des patientes dans le cadre d'une prévention.

## Hypothèse de Barker

L'origine fœtale des maladies de l'adulte, ou « hypothèse de Barker » est basée sur l'hypothèse que des perturbations du développement fœtal peuvent aller jusqu'à entraîner des modifications métaboliques irréversibles et ainsi augmenter le risque de maladies à l'âge adulte [1,2], voire de troubles psychiques (troubles de la personnalité, schizophrénie) [3-6].

Cette hypothèse a été initialement proposée après la constatation d'un taux élevé de mortalité infantile au début du XX<sup>e</sup> siècle en Angleterre associé à un taux élevé de décès à l'âge adulte par maladies coronariennes [1]. La première cause de mortalité infantile étant liée au petit poids de naissance, les enfants nés hypotrophes qui survivaient à cet état semblaient présenter plus de risque de développer une maladie coronarienne à l'âge adulte [1]. Deux autres études ont retrouvé un lien entre le décès par maladie coronarienne chez les hommes et le petit poids de naissance, le périmètre crânien et l'index pondéral réduits [7,8]. Ce lien est aussi plus marqué pour les enfants avec retard de croissance que pour les prématurés [8]. De plus, une revue extensive de la littérature faite par Huxley [9] montre que le poids de naissance et le périmètre crânien à la naissance sont inversement proportionnels à la pression artérielle à l'âge adulte. Des résultats identiques ont été retrouvés dans d'autres pays, dans des études rétrospectives et même prospectives [10-13].

On a depuis toujours associé le risque de maladie coronarienne à des facteurs prédisposants, essentiellement liés à l'environnement et au mode de vie (alimentation, exercice physique...). Cependant, des études montrent que la correction de ces facteurs de risque n'efface pas complètement la prédisposition programmée initialement et donc n'élimine pas le développement de maladies à l'âge adulte [10,11,14]. En particulier, le faible poids de naissance est associé à un niveau de résistance plus élevé à l'insuline, et à une incidence accrue de diabète de type 2 [15], alors que périmètre abdominal néonatal est prédictif du taux de cholestérol et de fibrinogène chez l'homme adulte, ces

deux facteurs étant reconnus comme des facteurs de risque de maladie coronarienne [16,17].

En ce qui concerne les problèmes psychiatriques, le risque de développer des troubles sévères de la personnalité ou une schizophrénie est multiplié par 2 lorsque la sous-nutrition survient au cours du premier, ou du deuxième trimestre, mais pas au cours du troisième [3,4]. Le faible index de masse corporel (IMC) semble lié au risque de schizophrénie, que ce soit l'IMC préconceptionnel [5] ou de fin de grossesse [6].

Enfin, d'autres pathologies de l'adulte comme des maladies pulmonaires, la prédisposition à certains cancers peuvent être liés à des mécanismes de programmation fœtale [18]. Cependant, si les liens épidémiologiques semblent solides, les mécanismes conduisant à cette « programmation fœtale » sont très mal connus.

## Phénomènes pouvant conduire à la « programmation fœtale »

### Malnutrition maternelle

La nutrition fœtale est bien sûr un élément fondamental de la croissance fœtale et est à ce titre une piste possible de mécanisme pour la programmation fœtale [19]. Chez de nombreux animaux (souris, rats, cochons, brebis, lapins), la restriction alimentaire maternelle induit chez la progéniture des retards de croissance, de l'hypertension, et/ou une intolérance au glucose [20-27], jusqu'à une diminution considérable de l'espérance de vie chez des souris dont la mère avait reçu une alimentation hypoprotéique. Ce lien entre insuffisance alimentaire maternelle et la nature des pathologies de l'adulte a été démontré chez l'homme au cours de grandes études épidémiologiques au Royaume-Uni (Angleterre et Pays de Galle, chez des enfants nés après la Première Guerre mondiale) [1,7,8] et par l'étude des conséquences de la famine aux Pays-Bas en 1944 [29]. Cependant, ces données sont parfois controversées du fait du faible nombre d'enfants.

Durant la grossesse, le métabolisme maternel s'adapte au contexte physiologique afin d'apporter les nutriments nécessaires au développement fœtal. En cas de jeûne, l'activité lipolytique s'accélère et les acides gras produits sont transformés par le foie en corps cétoniques et en glucose qui passeront aisément la barrière placentaire afin de soutenir le métabolisme fœtal. Le glucose franchit la barrière placentaire par diffusion facilitée selon le gradient de concentration de part et d'autre des membranes. Les acides aminés utilisent des transporteurs sélectifs dépendants de l'énergie. Cependant, la connaissance des mécanismes impliquant le transport des lipides est encore limitée, mais implique des récepteurs placentaires et des protéines de transport transmembranaires.

### Restriction globale du niveau énergétique de l'apport nutritionnel maternel

La théorie du « phénotype économe », proposée par Barker et Hales [30], propose que l'insulinorésistance et le diabète de type 2 observés chez l'adulte résulteraient de l'hypoglycémie intra-utérine subie par le fœtus [30]. Pendant des périodes de sous-nutrition maternelle, le fœtus réduirait

sa sécrétion d'insuline entraînant une augmentation de la résistance périphérique à l'insuline pour privilégier le cerveau et le cœur aux dépens de tous les autres tissus [31]. Si les apports nutritionnels sont normaux ou abondants durant la période postnatale, le déficit en cellules bêta du pancréas et l'insulinorésistance entraîneraient une intolérance au glucose, voire un diabète. Cela expliquerait pourquoi les bébés de faible poids ont tendance à développer un excès pondéral et un diabète de type 2 [32,33]. Gluckman et Hanson ont revisité cette théorie et proposent une autre interprétation [34] : Lorsqu'il y a une perturbation dans le développement intra-utérin, par exemple une sous-nutrition maternelle ou un taux élevé de glucocorticoïdes, le métabolisme fœtal s'adapte afin d'assurer la survie. Ces adaptations sont le plus souvent réversibles. Cependant, si le changement est durable, le fœtus est contraint de mettre en place une réponse adaptative irréversible, qui peut ne pas être utile d'emblée mais demeurerait inductible à long terme. Le fœtus « se préparerait » ainsi à la vie extra-utérine, et serait donc prêt à faire face à un contexte de sous-nutrition. L'hypothèse est en vogue mais encore très controversée [34]. Cela pourrait être le cas pour les fœtus de mères insuffisamment nourries pendant la grossesse dont l'enfant est élevé dans un contexte d'abondance alimentaire, comme dans certains pays en voie de développement [35,36]. De même, des fœtus de rates soumises à un régime riche en graisses développent après la naissance une altération des fonctions endothéliales et sont hypertendus, mais s'ils reçoivent le même régime gras, les cellules endothéliales semblent mieux protégées, même si l'hypertension persiste [37].

#### Restriction protéique

L'expérience de Ozanne montre que chez un fœtus de rat de petit poids de naissance en raison d'une restriction de l'apport protéique à la mère, une restriction protéique après la naissance protège en partie contre les effets délétères d'un régime induisant l'obésité. Au contraire, un régime hyperprotéique durant la période néonatale, visant à rattraper le déficit de croissance, induit une diminution de l'espérance de vie et rend les rats plus susceptibles de développer des complications liées à un régime induisant une obésité [28].

#### Cas particulier des métabolites lipidiques

Le placenta humain est relativement perméable aux acides gras et au cholestérol. Les acides gras fœtaux proviennent essentiellement de la mère en début de grossesse et la synthèse de novo à partir de glucose s'intensifie progressivement chez le fœtus au cours de son développement. La concentration plasmatique en acides gras libres est toujours plus élevée chez la mère que chez le fœtus, mais les deux restent corrélés avec un rapport foetomaternel inférieur à 0,5 [38]. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne transportés par les lipoprotéines sont pris en charge par des récepteurs placentaires ou parfois transférés directement au fœtus. Des modifications d'apports d'acides gras pendant la grossesse peuvent affecter la nature des acides gras délivrés au fœtus et avoir des conséquences sur la maturation neuronale et le développement postnatal. De plus, l'hypercholestérolémie maternelle entraîne l'appari-

tion de lésions préathérosclérotiques dès la vie fœtale [39]. Chez la lapine, un régime hypercholestérolémique donné dans les jours précédents l'accouplement induit un retard de croissance intra-utérin, prouvant que les effets délétères de l'hypercholestérolémie chez le lapin ont une répercussion physiopathologique immédiate sur le fœtus [40].

#### Glucocorticoïdes

Un excès d'exposition aux glucocorticoïdes peut également avoir des effets à long terme pour le fœtus. Cet excès peut être dû à des sécrétions par la mère, à un apport exogène, à un trouble de la barrière placentaire.

Des taux élevés de cortisol d'origine maternelle sont associés à une élévation de la pression artérielle chez la brebis [41,42]. Chez le rat, les fœtus exposés à la dexaméthasone par injections maternelles ont un poids inférieur à la normale, à la naissance, et présentent à l'âge adulte une pression artérielle plus élevée et une intolérance au glucose [43,44]. Des administrations répétées de bêtaméthasone à la mère ont le même effet sur le fœtus de brebis [45] et ces effets apparaissent par la médiation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien fœtal. En effet, lors d'exposition prolongée, il y a une réduction du nombre de récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus, entraînant une réduction du rétrocontrôle négatif et par conséquent une activation de l'axe hypothalamohypophysaire-surrénalien après la naissance. Cette activation a pour conséquence une augmentation de la pression artérielle et une intolérance au glucose [46,47]. Le stress prénatal expose également le fœtus à des doses élevées de cortisol endogène [47]. Un stress maternel important peut entraîner des conséquences à long terme et modifier ainsi la réponse au stress du jeûne, dès la période embryonnaire [48]. Les mécanismes impliqués seraient la modification de l'expression des récepteurs stéroïdiens du système limbique par méthylation des gènes [49,50], mais d'autres mécanismes complexes peuvent aussi intervenir [47].

Certaines données chez la femme corroborent ces résultats : des administrations répétées de bêtaméthasone pendant la grossesse induisent une diminution de l'activité placentaire de la 11BHS 2 (11bêtahydroxystéroïde déshydrogénase type 2) [51] et une diminution du poids et de la taille du fœtus, sans que des données soient disponibles à long terme [52,53]. La 11BHS 2 joue un rôle très important dans la croissance fœtale, car elle transforme le cortisol actif en cortisone inactive, ce qui protège le fœtus des effets délétères d'un excès maternel de minéralocorticoïdes ou de glucocorticoïdes. Les effets à long terme de la corticothérapie anténatale à visée de maturation pulmonaire fœtale sur la tension artérielle apparaissent parfois contradictoires dans la littérature : Doyle et al. [54] retrouvent une nette augmentation de la pression artérielle systolique et diastolique dans le groupe exposé à l'âge de 14 ans, ce qui n'est pas retrouvé pour Dessens et al. qui retrouvent au contraire une diminution de la pression artérielle systolique [55]. Cependant, une seule cure de bêtaméthasone (deux injections de 12 mg à 24 heures d'inter-

valle) n'a pas entraîné de conséquences à l'âge de 30 ans, en dehors d'une insulino-résistance modérée [56].

### Effets périconceptionnels

Des études chez l'animal ont montré la répercussion des déséquilibres de la nutrition périconceptionnelle de la mère sur le fœtus. Par exemple, la sous-nutrition chez la brebis gestante au cours du premier tiers de la gestation est associée avec une accumulation excessive de graisse en fin de gestation [57,58]. Chez le rat, une sous-nutrition maternelle en période préimplantatoire induit des anomalies des blastocystes et une hypertension artérielle dans la descendance [59]. Chez la femme, une relation a récemment été montrée entre un régime amaigrissant en période préconceptionnelle, l'activité placentaire de la 11B-HSD 2 et de la COX 2 (cyclo-oxygénase type 2), et la durée de la grossesse [60,61]. Les données actuelles sont encore trop parcellaires pour reconnaître un lien entre ces phénomènes et un mécanisme de programmation fœtale, mais il convient d'être vigilant en ce qui concerne les possibles conséquences à long terme des troubles de nutrition périconceptionnels.

### Génétique et épigénétique

Les modifications épigénétiques (associant méthylations et acétylations de l'ADN et des modifications des histones) assurent, par un remodelage adéquat de la chromatine, la modulation de l'expression des gènes. Les facteurs nutritionnels (nutriments, restriction calorique, stress...) constituent des facteurs importants pour la modulation de l'expression des gènes. Parmi les nutriments, il faut souligner le rôle particulièrement important des folates dont le métabolisme génère une source de groupements méthyle nécessaires à de nombreuses réactions biologiques comme la synthèse d'ADN et la méthylation de l'ADN et des histones. Contrairement aux mutations dans la séquence d'ADN qui sont irréversibles, les modifications épigénétiques sont en principe instables et réversibles. En revanche, les perturbations alimentaires et métaboliques subies au cours de la vie fœtale et postnatale ainsi que les conséquences pathologiques d'un déséquilibre énergétique prolongé peuvent entraîner des modifications épigénétiques irréversibles [62]. Par exemple, le niveau de méthylation de l'ADN du foie de rat est modifié par un régime pauvre en protéine pendant la gestation [63]. Un autre exemple de modification épigénétique d'origine fœtale a été bien étudié chez la souris *Agouti viable yellow A<sup>vy</sup>* [64] : les changements de coloration du pelage ainsi que d'autres aspects phénotypiques (hyperinsulinisme, obésité, tumeurs) dépendent de la méthylation d'une séquence transposable insérée à proximité du gène A. À la génération suivante, les phénotypes variables observés sont dus à l'effacement incomplet de la modification épigénétique. Enfin, un régime riche en méthyle pendant la gestation augmente la proportion de petits porteurs de séquences IAP méthylées. Des changements dans l'environnement intra-utérin sont donc susceptibles de modifier l'expression de gènes via des modifications de méthylation et éventuellement induire des pathologies chez l'adulte [64].

### Effets intergénérationnels

Il existe de plus en plus de preuves pour affirmer qu'un événement indésirable survenant pendant la grossesse affecte le conceptus, mais aussi ses descendants. Lors de la famine aux Pays-Bas, en 1944-1945, les mères exposées au premier trimestre ont donné naissance à des enfants de poids normal, mais ces enfants ont par la suite donné naissance à des enfants plus petits [65]. La première hypothèse est que l'environnement hormonal fœtal des mères sous-nutries pourrait influencer le développement des organes génitaux qui sont plus petits, et pourrait ainsi altérer la croissance des fœtus [66]. La seconde hypothèse est la transmission des modifications épigénétiques [67]. Enfin, il y a un effet intergénérationnel des facteurs de risque de maladie cardiovasculaire : un petit poids de naissance est associé à un risque accru d'hypertension pendant la grossesse, qui est elle-même un facteur de risque d'hypertrophie fœtale [48, 68].

### Conclusion

Les mécanismes moléculaires et génétiques spécifiques conduisant à la programmation fœtale et aux maladies de l'adulte restent encore à découvrir. Pour cela, la recherche animale est indispensable. Les outils qui se développent actuellement, en particulier pour l'étude de l'expression des gènes et l'étude des protéines vont certainement apporter des indices indispensables à la compréhension de ces phénomènes. Cependant, le rôle du gynécologue-obstétricien en termes de prévention est fondamental. La consultation prénuptiale, ou au mieux une consultation préconceptionnelle, pourrait permettre d'informer les futurs parents sur l'importance de la lutte contre l'obésité et les facteurs de risques cardiovasculaires. Un objectif de poids pourrait alors être fixé, par exemple en visant un IMC entre 20 et 25. Un rappel des règles hygiéno-diététiques élémentaires (alimentation équilibrée en quantités suffisantes, activité physique) est indispensable. La patiente comprendra l'intérêt pour elle-même, mais aussi pour le futur état cardiovasculaire de son enfant. Il ne faut pas considérer les troubles de malnutrition comme une fatalité, mais lutter contre eux, et inciter nos patientes à faire le plus tôt possible un bilan diététique. En cours de grossesse, l'obstétricien doit veiller à ce que la prescription de médicaments, en particulier de glucocorticoïdes, soit limitée au strict nécessaire, par exemple en évitant les cures répétées de corticoïdes à visée de maturation pulmonaire fœtale.

### Références

- [1] Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986;10:1077-81.
- [2] de Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006;46:4-14.
- [3] Neugebauer R, Hoek HW, Susser E. Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *JAMA* 1999;282:455-62.

- [4] Susser E, Neugebauer R, Hoek HW, Brown AS, Lin S, Labovitz D, et al. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53(1):25-31.
- [5] Schaefer CA, Brown AS, Wyatt RJ, Kline J, Begg MD, Bresnahan MA, et al. Maternal prepregnant body mass and risk of schizophrenia in adult offspring. *Schizophr Bull* 2000;26:275-86.
- [6] Wahlbeck K, Osmond C, Forsen T, Barker DJ, Eriksson JG. Associations between childhood living circumstances and schizophrenia: a population-based cohort study. *Acta Psychiatr Scand* 2000;104:356-60.
- [7] Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
- [8] Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* 1993;306:422-6.
- [9] Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens* 2000;18:815-31.
- [10] Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed-up since 1976. *BMJ* 1997;315:396-400.
- [11] Frankel S, Elwood P, Sweetnam P, Yarnell J, Smith GD. Birth-weight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease. *Lancet* 1996;30:1478-80.
- [12] Stein CE, Fall CH, Kumaran K, Osmond C, Cox V, Barker DJ. Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet* 1996;9:1269-73.
- [13] Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* 1993;11:1519-24.
- [14] Leon DA, Lithell HO, Vagero D, Koupilova I, Mohsen R, Berglund L, et al. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-1929. *BMJ* 1998;25:241-5.
- [15] Newsome CA, Shiell AW, Fall CH, Phillips DI, Shier R, Law CM. Is birth weight related to later glucose and insulin metabolism? A systematic review. *Diabet Med* 2003;20:339-48.
- [16] Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Wield GA. Abnormal liver growth in utero and death from coronary heart disease. *BMJ* 1995;18:703-4.
- [17] Barker DJ, Meade TW, Fall CH, Lee A, Osmond C, Phipps K, et al. Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII concentrations in adult life. *BMJ* 1992;304:148-52.
- [18] Schmidt-Kastner R, van Os JWM, Steinbusch H, Schmitz C. Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophr Res* 2006;84:253-71.
- [19] Harding JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 2001;30:15-23.
- [20] Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr* 1996;76:591-603.
- [21] Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* 1996;40:438-43.
- [22] Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci* 1996;91:607-15.
- [23] Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intrauterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999;58:615-9.
- [24] Kind KL, Clifton PM, Grant PA, Owens PC, Sohlstrom A, Roberts CT, et al. Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R140-R152.
- [25] Kind KL, Simonetta G, Clifton PM, Robinson JS, Owens JA. Effect of maternal feed restriction on blood pressure in the adult guinea pig. *Exp Physiol* 2002;87:469-77.
- [26] Gardner DS, Tingey K, Van Bon BW, Ozanne SE, Wilson V, Dandrea J, et al. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R945-R947.
- [27] Gopalakrishnan GS, Gardner DS, Rhind SM, Rae MT, Kyle CE, Brooks AN, et al. Programming of adult cardiovascular function after early maternal undernutrition in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R12-R20.
- [28] Ozanne SE, Hales NC. Catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 2004;427:411-2.
- [29] Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 2005;20:345-52.
- [30] Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
- [31] Phillips DI. Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition. *Diabetologia* 1996;39:1119-22.
- [32] Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Jaddoe VW, Osmond C, Barker DJ. Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* 2002;45:342-8.
- [33] Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life. *Diabetologia* 2003;46:190-4.
- [34] Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* 2004;56:311-7.
- [35] Yajnik CS. Early life origins of insulin resistance and type 2 diabetes in India and other Asian countries. *J Nutr* 2004;134:205-10.
- [36] Yajnik CS. Obesity epidemic in India: intrauterine origins? *Proc Nutr Soc* 2004;63:387-96.
- [37] Khan I, Dekou V, Hanson M, Poston L, Taylor P. Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 2004;31:1097-102.
- [38] Feldman M, Van Aerde JE, Clandinin MT. Lipid accretion in the fetus and newborn. In: Polin RA, Fox WW, editors. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 299-314.
- [39] Napoli C, Witztum JL, Calara F, de Nigris F, Palinski W. Maternal hypercholesterolemia enhances atherogenesis in normocholesterolemic rabbits, which is inhibited by antioxidant or lipid-lowering intervention during pregnancy: an experimental model of atherogenic mechanisms in human fetuses. *Circ Res* 2000;87:946-52.
- [40] Montoudis A, Simoneau L, Brissette L, Forest J-C, Savard R, Lafond J. Impact of a cholesterol enriched diet on maternal and fetal plasma lipids and fetal deposition in pregnant rabbits. *Life Sci* 1999;64:2439-50.
- [41] Jensen EC, Gallaher BW, Breier BH, Harding JE. The effect of a chronic maternal cortisol infusion on the late-gestation fetal sheep. *J Endocrinol* 2002;174:27-36.
- [42] Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol* 1992;77:709-17.
- [43] Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure

- in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 1996;64: 412-8.
- [44] Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* 1998;15:2174-81.
- [45] Moss TJ, Sloboda DM, Gurrin LC, Harding R, Challis JR, Newnham JP. Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R960-R970.
- [46] Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004;151:49-62.
- [47] Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol* 2006;572:31-44.
- [48] Matthews SG, Owen D, Banjanin S, Andrews MH. Glucocorticoids, hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) development, and life after birth. *Endocr Res* 2002;28:709-18.
- [49] Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004;7:847-54.
- [50] Phillips DI, Jones A. Fetal programming of autonomic and HPA function: do people who were small babies have enhanced stress responses? *J Physiol* 2006;572:45-50.
- [51] McTernan CL, Draper N, Nicholson H, Chalder SM, Driver P, Hewison M, et al. Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86: 4979-83.
- [52] French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:114-21.
- [53] Thorp JA, Jones PG, Knox E, Clark RH. Does antenatal corticosteroid therapy affect birth weight and head circumference? *Obstet Gynecol* 2002;99:101-8.
- [54] Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci* 2000;98:137-42.
- [55] Dessens AB, Haas HS, Koppe JG. Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics* 2000;105:E77.
- [56] Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, et al. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;365:1856-62.
- [57] Bispham J, Gopalakrishnan GS, Dandrea J, Wilson V, Budge H, Keisler DH, et al. Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology* 2003;144: 3575-85.
- [58] Edwards LJ, McFarlane JR, Kauter KG, McMillen IC. Impact of periconceptual nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R39-R45.
- [59] Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000;127:4195-202.
- [60] Johnstone JF, Lewis RM, Crozier S, Inskip H, Hanson M, Challis JRG, et al. Maternal body composition prior to conception and age : relationship with the duration of gestation. 3rd International Congress on Developmental origins of Health and Disease, Toronto; 2005: O-086.
- [61] Johnstone JF, Lewis RM, Crozier S, Zelsman M, Inskip H, Hanson M, et al. Pre pregnant maternal dieting status and its relation to gestation length and placental COX 2 protein levels. 3rd International Congress on Developmental origins of Health and Disease, Toronto; 2005: P3-069.
- [62] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-93.
- [63] Rees WD, Hay SM, Brown DS, Antipatis C, Palmer RM. Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J Nutr* 2000;130:1821-6.
- [64] Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63-8.
- [65] Stein AD, Lumey LH. The relationship between maternal and offspring birth weights after maternal prenatal famine exposure: the Dutch Famine Birth Cohort Study. *Hum Biol* 2000;72: 641-54.
- [66] Ibanez L, Potau N, Enriquez G, de Zegher F. Reduced uterine and ovarian size in adolescent girls born small for gestational age. *Pediatr Res* 2000;47:575-7.
- [67] Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* 2003;59:21-32.
- [68] Klebanoff MA, Secher NJ, Mednick BR, Schulsinger C. Maternal size at birth and the development of hypertension during pregnancy: a test of the Barker hypothesis. *Arch Intern Med* 1999; 159:1607-12.

## Annexe 2: Nutrition maternelle : incidence sur la fertilité de la descendance et importance de la période périconceptionnelle pour le long terme<sup>223</sup>



ELSEVIER  
MASSON

Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Gynécologie Obstétrique & Fertilité 36 (2008) 920–929



<http://france.elsevier.com/direct/GYOBF/>

Treizièmes Journées nationales de la FFER (Paris, 17–19 septembre 2008)

### Nutrition maternelle : incidence sur la fertilité de la descendance et importance de la période périconceptionnelle pour le long terme

### Maternal nutrition: Effects on offspring fertility and importance of the periconceptional period on long-term development

P. Chavatte-Palmer<sup>a,b,c,d,\*</sup>, K. Al Gubory<sup>a,b,c</sup>, O. Picone<sup>a,b,c,e</sup>, Y. Heyman<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>UMR INRA/ENVA/INA P-G 1198 biologie du développement et reproduction, 78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>b</sup>UMR 1198 biologie du développement et reproduction, ENVA, 78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>c</sup>CNRS, FRE 2857, 78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>d</sup>Fondation PremUp, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

<sup>e</sup>Service de gynécologie-obstétrique, hôpital Antoine-Béclère, AP-HP, 157, rue de la Porte-de-Trivaux, 92141 Clamart, France

Reçu le 27 juin 2008 ; accepté le 29 juin 2008

Disponible sur Internet le 9 août 2008

#### Résumé

Les origines développementales des maladies de l'adulte (*developmental origins of human adult diseases* ou DOHAD) ont été mises en évidence par les effets à long terme de la malnutrition maternelle durant la période foetale sur la descendance, incluant des effets sur la fertilité. Il a récemment été montré que les conditions nutritionnelles et l'environnement maternel durant la période préconceptionnelle jouent aussi un rôle majeur dans la programmation de la susceptibilité de la descendance à des maladies métaboliques. Les modifications épigénétiques potentiellement induites par les macro- ou les micro-nutriments, par le stress oxydatif ou par l'intermédiaire du statut endocrinien maternel font l'objet de nombreuses études mécanistiques dans ce domaine. Cet article détaille les données disponibles en s'appuyant sur les nombreux travaux effectués chez les animaux. © 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

The Developmental origins of human adult diseases (DOHAD) has initially emphasised the effects of maternal undernutrition during foetal development on long-term outcomes in the adult offspring, including effects on fertility. More recent work has provided evidence that preconceptional nutritional conditions and periconceptional environment also play a major role in programming the offspring susceptibility to disease. Epigenetic mechanisms, which may be mediated by macro- and micro-nutriments, endocrine status and oxidative stress, are the focus of the mechanistic studies aimed at understanding the processes involved in these effects. This article details available data in the area, using examples from numerous animal studies.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Développement ; Nutrition ; Fertilité ; Environnement maternel

**Keywords:** Development; Nutrition; Fertility; Maternal environment

## 1. Introduction

### 1.1. La programmation métabolique

Des études épidémiologiques chez l'Homme ont permis de démontrer que l'incidence des maladies métaboliques de l'adulte (obésité, hypertension, résistance à l'insuline, syn-

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [pascale.chavatte@jouy.inra.fr](mailto:pascale.chavatte@jouy.inra.fr) (P. Chavatte-Palmer).

drome métabolique) est nettement augmentée quand la nutrition maternelle est perturbée à des périodes critiques du développement fœtal [1,2]. Ce phénomène d'importance pour la santé humaine est communément appelé programmation fœtale ou programmation métabolique. De nombreux modèles animaux sont utilisés pour analyser ses mécanismes. De plus, les perturbations précoces peuvent induire une réponse adaptative prédictive des gènes qui contrôlent le développement, c'est-à-dire que les modifications génétiques ne sont pas immédiatement favorables à la survie, mais seront utiles pendant la période postnatale dans l'environnement prédictif (restreint si l'environnement fœtal est lui-même restreint) [2]. Ces modifications deviennent néfastes si l'environnement postnatal ne correspond pas à l'environnement prédit. S'il a été montré par de nombreuses équipes que l'alimentation maternelle durant la vie fœtale pouvait affecter le développement à long terme de la descendance, certains modèles animaux indiquent qu'une restriction alimentaire périconceptionnelle affecte le développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien de la descendance, le développement cardiovasculaire ainsi que d'autres paramètres. Ainsi, les fenêtres de susceptibilité du conceptus à la programmation métabolique s'étendent à la période préimplantatoire [3–6].

Quelle que soit la fenêtre de temps, les effets passent par l'altération de l'expression de gènes clés impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, comme le métabolisme du glucose, l'adipogénèse, la réponse des adipocytes aux corticostéroïdes, ou la fonction surrénalienne. Des mécanismes épigénétiques sont certainement aussi mis en jeu et quelques gènes semblent plus sensibles à ces perturbations environnementales, comme cela a été démontré chez la souris avec l'épi-allèle métastable du gène *pseudo-agouti*. Dans ce modèle, la supplémentation nutritionnelle maternelle avec des folates et des groupements donneurs de méthyle durant la gestation permet de modifier l'expression de cet allèle en changeant le niveau de méthylation des gènes (et donc les marquages épigénétiques) chez la descendance [7–9].

Comme des modifications épigénétiques majeures ont lieu durant la période préimplantatoire, il est logique que les altérations du milieu de l'embryon par le biais de l'alimentation maternelle ou de la culture *in vitro* puissent affecter de manière permanente l'expression de gènes chez la descendance.

### 1.2. Le concept de la chaîne d'approvisionnement (*supply line concept*)

L'apport de substrats est essentiel pour la croissance et le développement de l'embryon, puis du fœtus. La Fig. 1 illustre le concept de cette chaîne d'approvisionnement, ou *supply line* [10], en mettant en évidence les différentes fenêtres de susceptibilité pendant lesquelles des perturbations de l'équilibre nutritionnel maternel ou néonatal pourraient entraîner des conséquences à long terme. L'état nutritionnel de la mère peut jouer un rôle sur le développement du fœtus à tous les stades de la reproduction. En effet, les réserves corporelles maternelles, avant même la conception, pourraient influencer la maturation oocytaire, conditionner l'environnement dans l'oviducte ainsi

que les réponses maternelles endocriniennes et métaboliques aux signaux embryonnaires précoces, qui affecteront ensuite le développement embryonnaire. Certains de ces effets pourraient même trouver leur origine au moment de l'ovogenèse maternelle, c'est-à-dire pendant la vie fœtale maternelle. Ainsi, l'alimentation de la grand-mère pendant sa grossesse pourrait affecter de manière transgénérationnelle la fertilité des petits-enfants. Après l'implantation, les échanges transplacentaires sont modulés par les signaux endocrines et métaboliques provenant du fœtus et de la mère. La qualité de l'implantation et de la placentation sont en partie dépendantes du nombre de cellules du blastocyste affectées à la masse cellulaire interne ou au trophoblaste. Après la naissance, les conditions nutritionnelles néonatales peuvent accentuer les effets de la programmation, en particulier lorsqu'il existe une grande différence entre le statut nutritionnel fœtal et postnatal (en particulier dans le cas de réponse adaptative prédictive).

De nombreuses revues de la littérature ont été publiées récemment sur l'influence de l'alimentation maternelle à tous les stades de la gestation sur la santé de la descendance [6,11–15]. Cet article fait un état des lieux des connaissances sur la programmation de la fertilité chez la descendance par l'environnement maternel au cours des périodes pré- et périconceptionnelles. Il est illustré d'exemples pris essentiellement chez l'animal, mais aussi de données obtenues chez l'Homme lorsqu'elles sont disponibles.

## 2. Influence de la vie fœtale sur la fertilité à l'âge adulte

Une sous-nutrition maternelle, et même dans certaines circonstances, un excès nutritionnel maternel, durant la gestation ou pendant la période néonatale peuvent affecter la fonction de reproduction de la descendance à l'âge adulte [16–18]. En effet, c'est durant ces fenêtres de développement que s'expriment les gènes de la différenciation ovarienne comme l'illustre la Fig. 2.

### 2.1. Réduction des apports maternels

Des études chez plusieurs espèces animales ont démontré un retard dans le déclenchement de la puberté et des taux d'ovulation réduits chez les femelles sous-nourries durant la période fœtale [16,19–22]. Peu d'effets sont notés chez les mâles [21], bien que des effets sur la puberté aient aussi été observés [23] avec, par exemple, un décalage de cinq semaines pour la mise en place de la puberté entre des agneaux ayant subi un retard de croissance intra-utérin (RCIU) et pesant, en moyenne, de 2,8 kg à la naissance et des témoins pesant en moyenne 5,2 kg à la naissance [24].

Chez la brebis, une restriction nutritionnelle de 50 % des besoins durant la période périconceptionnelle (pendant les 30 jours suivant la fécondation, sachant que la gestation dure 150 jours chez la brebis et que l'implantation a lieu autour de 20 jours) induit un retard dans le développement de l'ovaire fœtal à 110 jours de gestation [25]. Ainsi, la sous-nutrition maternelle précoce affecte la prolifération cellulaire et l'expression des gènes régulant l'apoptose dans l'ovaire du fœtus, avec des différences entre les mécanismes selon les

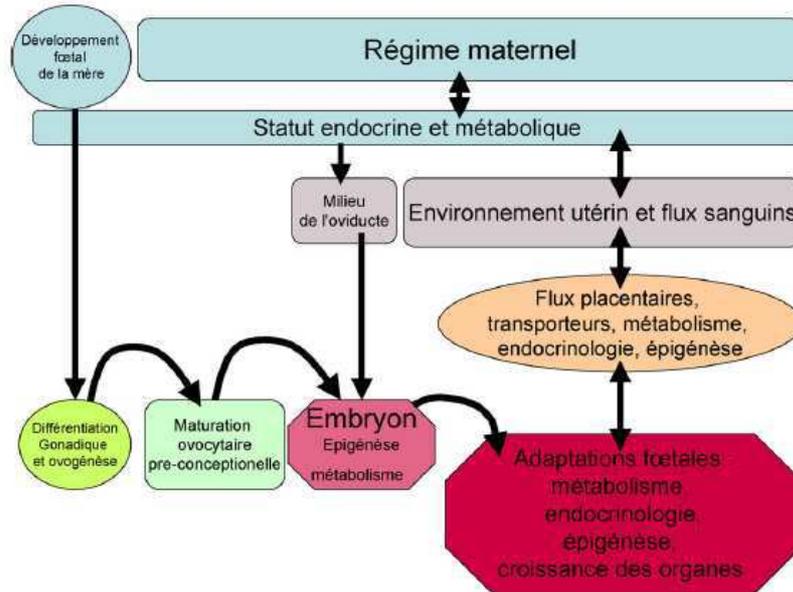


Fig. 1. L'embryon, le fœtus et leur chaîne d'approvisionnement : comment les conditions maternelles peuvent influencer le développement à long terme de la descendance (étendu et adapté à partir du graphe initial de [10]).

périodes d'exposition [26,27]. De plus, on note une augmentation de l'incidence de modifications de l'ADN dans l'ovaire fœtal, associée à la surexpression de la protéine antitumorale p53, du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et d'une polymérase de réparation de l'ADN [28]. Ces changements sont peut-être les premiers mécanismes à travers lesquels la nutrition maternelle affecte le développement précoce et la fonction gonadique.

L'axe hypothalamo-hypophysogonadique est parfois aussi affecté, mais de façon sexe-dépendante avec des effets plus marqués chez les mâles [23,29-31].

Chez les bovins, des données récentes montrent qu'un indice de masse corporelle élevé durant la gestation a un effet favorable sur l'état corporel des filles à l'âge adulte et sur leur fertilité [32].

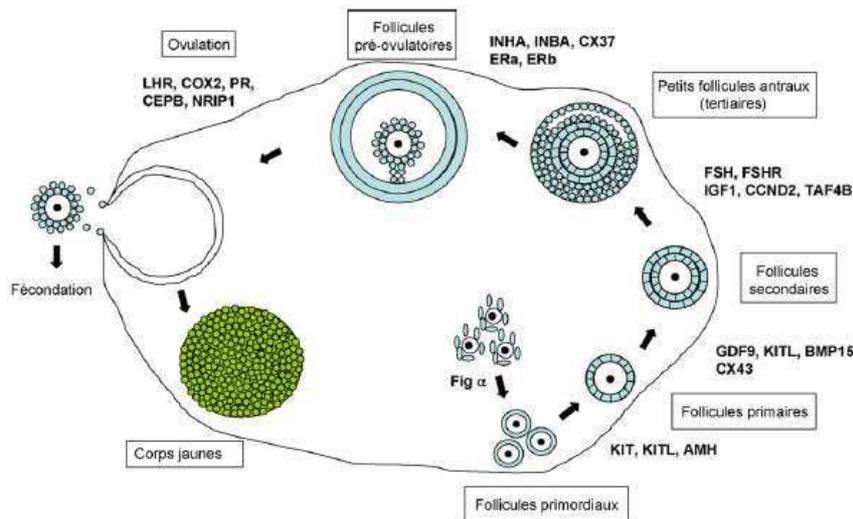


Fig. 2. Gènes impliqués dans le développement ovarien (dessin du Dr Béatrice Mandon-Pépin). Chez la brebis, la différenciation du sexe gonadique a lieu 30 à 32 jours après la conception chez le mouton, et la méiose femelle commence à 55 jours. Les follicules primordiaux apparaissent à 75 jours, les primaires à 100 jours, les secondaires à 120 jours et les tertiaires à 135 jours de gestation.

Bien que certains de ces effets soient relativement limités, ils affectent la vie reproductive des animaux et peuvent avoir des conséquences économiques non négligeables. Si de tels effets existent aussi chez l'Homme, les conséquences sur la fertilité peuvent être cliniquement significatives.

## 2.2. Surnutrition maternelle

Une surnutrition maternelle peut aussi affecter les performances de reproduction de la descendance. Dans le modèle ovin d'adolescente obèse développé par Jacqueline Wallace et al., au Rowett Institute en Écosse, un excès nutritionnel maternel induit un RCIU chez la descendance [33], avec un retard de développement des ovaires chez les femelles [24]. L'expression de LH hypophysaire est augmentée chez les fœtus RCIU issus de brebis surnourries comparés à des fœtus de taille normale issus de brebis nourries normalement [34]. Bien qu'il n'y ait pas de différences significatives pour la sécrétion de FSH, les auteurs ont aussi observé une diminution du nombre de follicules sur les ovaires issus des brebis surnourries, quel que soit le poids fœtal. On observe cependant une corrélation positive entre le nombre total de follicules et le poids placentaire.

La surnutrition est relativement rare en production animale, mais ces données sont importantes au vu de la progression rapide de l'obésité chez l'Homme (prévalence multipliée par trois dans les 20 dernières années), et des prévisions de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) d'environ 150 millions d'adultes obèses (20 % de la population) et 15 millions d'enfants et adolescents obèses (10 % de la population) dans la zone européenne en 2010 (<http://www.euro.who.int/obesity>).

## 2.3. Effets transgénérationnels

Les effets transgénérationnels du poids à la naissance ont été démontrés chez l'Homme dans les études sur les conséquences de la famine hollandaise durant la Seconde Guerre mondiale. En automne 1944, les Allemands installèrent un embargo sur le transport des marchandises, qui fut suivi d'un hiver très sévère à l'origine d'une famine bien documentée qui s'est terminée au printemps 1945 [35]. Les femmes dont les mères ont subi cette famine durant le premier ou le deuxième trimestre de la grossesse ont eu des enfants de poids significativement réduit par rapport aux femmes dont les mères n'ont pas été exposées à la famine. Cet écart dans le poids de naissance était dû, d'une part, à une croissance fœtale réduite et, d'autre part, à des grossesses plus courtes. En revanche, le poids à la naissance des petits-enfants des femmes ayant subi la famine dans le troisième trimestre n'a pas été diminué [36].

## 3. Influences de l'alimentation périconceptionnelle

Comme il est précisé plus haut, les fenêtres de susceptibilité à la programmation s'étendent jusqu'à la période périconceptionnelle [6,14].

En élevage animal, il est d'usage de sur-nourrir les animaux durant les jours et même les semaines avant la mise à la

reproduction (ovins, bovins). Cette augmentation ponctuelle de l'apport énergétique fourni par la ration alimentaire dans la période précédant la gestation, ou *flushing*, améliore les taux d'ovulation, en particulier chez les animaux maigres, et permet ainsi d'optimiser les performances de reproduction [37,38]. On sait maintenant que la nutrition maternelle durant la période périconceptionnelle affecte le développement embryonnaire avec des effets à long terme sur le développement fœtal et postnatal et la susceptibilité aux pathologies de l'adulte. Ces effets sont exercés durant la maturation ovocytaire et la différenciation embryonnaire.

### 3.1. Maturation ovocytaire

#### 3.1.1. Acides gras

Les acides gras sont des lipides classés en deux catégories en fonction de leur structure biochimique, c'est-à-dire de la présence ou non de doubles liaisons : les acides gras saturés et insaturés. Les acides gras essentiels sont polyinsaturés. Ils sont dits essentiels, car leurs précurseurs, qui sont l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) et l'acide linoléique (LA), ne peuvent être synthétisés par notre organisme. Leur apport par l'alimentation est donc indispensable. Les principaux dérivés de l'ALA sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA). Ils constituent le groupe des omégas 3 (double liaison sur le carbone 3). De même, le LA et ses dérivés à longues chaînes polyinsaturées que sont l'acide dihomogammalinoléique et l'acide arachidonique (AA) constituent le groupe des omégas 6 (double liaison sur le carbone 6).

Les acides gras sont tous source d'énergie, mais les acides gras essentiels présentent des fonctions métaboliques. Leur métabolisme conduit, d'une part, à la synthèse de dérivés à longue chaîne constitutifs de toutes les membranes cellulaires (rôle structural) et, d'autre part, à la synthèse de médiateurs bioactifs sous la forme de molécules oxygénées (eicosanoïdes, docosanoïdes...). Les acides gras essentiels et leurs dérivés oxygénés régulent également de multiples voies métaboliques en modulant certains processus de signalisation intracellulaire, ainsi que l'expression de gènes cibles via l'activation spécifique de facteurs de transcription. L'EPA et ses métabolites ont des effets directs sur l'inflammation et la réponse immunitaire.

Chez les bovins, on utilise parfois un régime enrichi en lipides pour augmenter l'énergie de la ration. Ce régime enrichi, lorsqu'il est utilisé dans la période périconceptionnelle, réduit le nombre de follicules petits et moyens dans l'ovaire, sans affecter la qualité des ovocytes ni le taux de clivage en fécondation in vitro (FIV). En revanche, le pourcentage de blastocystes obtenus à partir d'ovocytes matures et clivés est significativement amélioré. Le nombre total de cellules est plus élevé, à la fois dans la masse cellulaire interne et dans le trophoblaste [39]. Enfin, la corrélation négative observée sans supplémentation entre la production laitière, la consommation importante de matière sèche et le taux de blastocystes est inexistante chez les animaux supplémentés, ce qui confirme d'autres études démontrant que l'effet de la supplémentation dépend de l'état corporel initial [40]. Dans une autre étude, il a été montré que la supplémentation de génisses avec des acides

gras (huile de palme) augmentait significativement la teneur lipidique des complexes cumulus-ovocytes sans altérer leur composition en acides gras du fait d'un passage sélectif des acides gras saturés dans l'ovocyte [41,42].

Au sein de notre laboratoire, nous avons observé chez le lapin que la supplémentation en lipides (huile de soja, 8 % de lipides au total dans la ration) et en cholestérol (0,2 %) à partir du début de l'adolescence jusqu'à la fin de la lactation affectait le développement *in vivo* de l'embryon avec un RCIU observé dès neuf jours après la fécondation, c'est-à-dire peu de temps après l'implantation. À l'âge adulte, les descendants des femelles supplémentées, tous nourris avec un régime témoin, sont néanmoins devenus plus lourds et plus gras. En revanche, il n'y a pas eu d'effet quand le régime a été administré seulement durant la gestation [43,44]. Chez la souris, l'administration d'un régime enrichi en acides gras polyinsaturés oméga 3 pendant quatre semaines avant la fécondation affecte significativement la distribution des mitochondries et les niveaux de calcium dans l'ovocyte et augmente la production de radicaux oxygénés [45]. De plus, bien que le nombre de zygotes obtenus après fécondation *in vivo* soit plus élevé dans le groupe traité, cette augmentation est surtout due à des zygotes de qualité médiocre. Ainsi, le développement jusqu'au stade blastocyste des embryons issus de souris traitées est significativement retardé. En revanche, ces effets ne sont pas constatés après fécondation *in vitro*, ce qui suggère que le fait de retirer l'ovocyte de l'environnement enrichi en oméga 3 permet de lui rendre son potentiel de développement normal [45].

### 3.1.2. Régime hypoprotéinique

Les régimes hypoprotéiniques administrés pendant la période de maturation ovocytaire induisent aussi des effets à long terme chez la descendance. Chez la souris, un régime hypoprotéinique (9 % caséine) administré durant le cycle préovulatoire, pendant les 3,5 jours avant la mise à la reproduction, n'affecte ni la durée de gestation, ni la taille de portée, le sex-ratio ou la croissance postnatale, mais induit des comportements anxieux, affecte le développement cardiovasculaire et diminue le nombre de néphrons dans le rein avec un effet marqué du sexe chez les descendants à l'âge adulte [46].

## 3.2. Période péri-implantatoire

### 3.2.1. Alimentation maternelle

Les effets à long terme de modifications de l'environnement préimplantatoire ont été démontrés chez les espèces de laboratoire et chez les ruminants. Chez la brebis, une restriction maternelle peu sévère (70 % des besoins) à partir de 60 jours avant jusqu'à sept jours après la fécondation induit une augmentation de la pression artérielle fœtale en fin de gestation chez les jumeaux, mais pas chez les singletons [47]. Cette observation est indépendante de tout effet sur le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA). De plus, ce même traitement induit des effets significatifs sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS), qui dépendent du nombre de fœtus et de leur sexe. La sous-nutrition périconceptionnelle induit des modifications des sécrétions endocrines, en particulier du profil

plasmatique de IGF1 et IGFBP-3 chez le fœtus ovin en cours de gestation, avec des conséquences possibles pour le développement des organes reproductifs [48]. Des naissances prématurées et une croissance fœtale diminuée ont été décrites après une restriction alimentaire sévère (28 % des besoins) pendant la période périconceptionnelle, avec une activation de l'axe HHS [4,49]. De plus, le poids des surrénales était réduit et accompagné d'une diminution de l'expression des gènes clés de la famille des IGF [50]. En revanche, dans l'étude que nous menons actuellement en collaboration avec l'équipe de Nathalie Debus à l'INRA, avec un régime moins sévère (50 % de besoins, entre 15 jours avant et 30 jours après la fécondation), nous n'avons pas trouvé d'effet sur la fertilité, ni sur la durée de gestation ou le poids à la naissance (Chavatte-Palmer P., Debus N., et al., données non publiées). Quoiqu'il en soit, les effets périconceptionnels sont observés jusqu'à une période très tardive chez la descendance. Par exemple, les modifications de la fonction cardiovasculaire sont encore observées à l'âge d'un an chez des moutons dont la mère a été sous-nourrie de la fécondation à 30 jours de gestation [51].

Chez les rongeurs, l'administration d'un régime hypoprotéinique durant la période qui suit la fécondation réduit le nombre total de cellules des embryons préimplantatoires, diminue le poids à la naissance avec des effets différents selon le sexe et l'espèce et induit ultérieurement des excès pondéraux, de l'hypertension et des comportements anxieux anormaux chez les descendants, en particulier chez les femelles [5,52]. Les mécanismes physiologiques d'adaptation à l'environnement maternel sont déjà observés au stade blastocyste avec une augmentation de l'endocytose au niveau de l'endoderme du sac vitellin [52]. Cette réponse pourrait être l'un des mécanismes physiologiques qui permettraient de stabiliser la croissance fœtale et d'améliorer la survie postnatale. Cependant, à long terme, l'activation de ces mécanismes peut aussi entraîner un excès de croissance pondérale et des maladies cardiovasculaires et comportementales.

### 3.2.2. Environnement de l'oviducte

L'environnement de l'oviducte joue certainement un rôle très important dans les effets périconceptionnels et péri-implantatoires. Les méthodes expérimentales de collecte du fluide de l'oviducte ont été résumées récemment par H. Leese et al. [53], mais il reste encore beaucoup d'études à mener pour explorer la relation entre la composition du milieu de l'oviducte et la programmation à long terme de la descendance. De plus, alors qu'on connaît assez bien la composition en glucides et en protéines de ce milieu, très peu de données sont disponibles sur la composition lipidique, bien que les lipides soient aussi importants dans le développement de l'ovocyte et de l'embryon [54].

## 4. Stress oxydatif, antioxydants et gestation

Les dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sont des sous-produits du métabolisme aérobie. Dans des conditions normales, il y a un équilibre entre la production de DAO et les niveaux intracellulaires d'enzymes antioxydantes. Cet

équilibre est essentiel pour la survie et la santé des organismes. Lorsque la production de DAO dépasse la capacité des systèmes antioxydants, on a un stress oxydatif qui peut détériorer les lipides, les protéines et les acides nucléiques et entraîner la mort cellulaire par apoptose. Le système anti-oxydant est un ensemble intégré d'enzymes antioxydantes et de nutriments antioxydants non enzymatiques. Les enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, glutathion réductase et glutathion transférase) sont la première ligne de défense contre le stress oxydatif. Les antioxydants non enzymatiques sont surtout le glutathion et les antioxydants provenant du régime alimentaire, comme l'acide ascorbique (vitamine C), l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), les caroténoïdes, les polyphénols et les flavonoïdes. De plus, les micronutriments essentiels comme le cuivre, le manganèse, le zinc et le sélénium sont vitaux, soit parce qu'ils font partie du site actif pour la fonction antioxydante, soit parce qu'ils agissent comme des cofacteurs dans la régulation des enzymes antioxydantes.

Les DAO présents en concentration excessive endommagent l'ADN, alors qu'un déficit en DAO affecte la signalisation cellulaire [55]. De nombreuses études montrent que les DAO perturbent les processus physiologiques comme la maturation ovocytaire, la stéroïdogenèse folliculaire et lutéale, l'implantation et le développement [56]. Ainsi, les DAO jouent un rôle dans beaucoup de pathologies gestationnelles comme la prééclampsie, les fausses couches, la résorption embryonnaire et les RCIU [57–59]. Par exemple, la production excessive de DAO à la suite de la mise en place de la circulation maternelle placentaire est importante dans la pathophysiologie des fausses-couches [60]. De même, le stress oxydatif joue un rôle dans les effets délétères du diabète gestationnel (avortements spontanés, anomalies congénitales, morbidité néonatales et mortalité). En particulier, un déficit en glutathion et une réduction de l'activité des enzymes dépendant du glutathion durant l'organogenèse sont impliqués dans le développement des malformations dues au diabète [61].

Cependant, la relation directe entre le stress oxydatif et la pathophysiologie intra-utérine n'est pas encore claire. Nous avons montré récemment dans notre équipe que les activités des enzymes dépendantes du glutathion augmentent significativement dans le placenta ovin en début de gestation, ce qui suggère que ces enzymes jouent un rôle contre le stress oxydant et l'apoptose durant le développement fetoplacentaire précoce [62].

Les éléments bioactifs du régime ont une influence sur toutes les cellules, à tous les niveaux. Les données obtenues chez l'Homme et l'animal montrent que des suppléments en vitamines antioxydantes, seules ou combinées avec d'autres suppléments, diminuent la mortalité embryonnaire et améliorent la survie fœtale et postnatale [63,64]. Cependant, la relation entre les concentrations de vitamines antioxydantes et le bon déroulement de la gestation n'a pas été faite chez l'Homme ni chez l'animal [65], et l'utilisation de doses pharmacologiques de vitamine C et E a un effet négatif chez la souris sur la taille de la portée [66]. Si l'apport direct de vitamines antioxydantes peut engendrer des risques de surdosage, le risque devrait être réduit par l'utilisation d'une

préparation à base de fruits et de légumes qui sont riches en enzymes antioxydantes et en micronutriments. Des études épidémiologiques ont montré les bénéfices pour la santé d'un régime riche en fruits et en légumes pour la prévention des cancers [67] et des maladies cardiovasculaires [68]. Récemment, un aliment nutraceutique combinant un extrait d'une variété de melon (*Cucumis melo* LC) à de la gliadine de blé (GliSODin<sup>®</sup> or Oxykiné<sup>®</sup>) a reçu beaucoup d'attention pour son usage comme supplément diététique antioxydant. Ce produit contient des enzymes antioxydantes et des molécules antioxydantes non enzymatiques ayant un effet tampon et des vitamines antioxydantes. Il a une activité antioxydante et anti-inflammatoire [69,70]. Une nouvelle formule de ce produit, spécialement préparée pour l'animal, améliore les performances de reproduction dans le modèle de souris abortive CBA/J-mated DBA/2J (Al-Gubory, Garrel, Blachier and Lacan, données non publiées).

## 5. Fécondation in vitro

### 5.1. Qualité des ovocytes

Comme cela a été développé précédemment, l'alimentation durant la période de développement des follicules à partir du moment où ils sortent de la réserve ovarienne (approximativement six mois avant l'ovulation chez la brebis et trois à quatre mois chez la vache) peut influencer les taux d'ovulation et la qualité des ovocytes, ainsi que le devenir de la descendance. La qualité de l'ovocyte peut être améliorée chez les ruminants par le *flushing*, en particulier sur les animaux maigres [41]. Ces effets passent en partie par le contenu cytoplasmique, puisque l'utilisation d'ovocytes provenant de brebis bien nourries améliore l'efficacité globale du clonage (du développement in vitro à la naissance d'animaux viables) par rapport à l'utilisation d'ovocytes provenant d'animaux sous-nourris [71].

En production animale, les animaux immatures sont parfois utilisés pour la production d'embryons in vitro, mais on constate des pertes embryonnaires importantes après transfert, car la qualité des ovocytes est mauvaise. Chez les ovins, la qualité des ovocytes récoltés à partir d'agneaux de neuf semaines pour la production d'embryons a pu être améliorée en nourrissant leurs mères avec un régime très énergétique (150 % des besoins énergétiques) en fin de gestation (entre 71–110 ou 101–126 jours de gestation) [71].

Néanmoins, si un épisode de surnutrition est certainement bénéfique pour les ruminants ovulant spontanément pour améliorer la qualité des ovocytes, les effets apparaissent très différents dans les cas de superovulation ou de ponctions ovocytaires répétées. Ces effets négatifs sont accentués chez les animaux de bonne condition corporelle, en particulier s'ils sont supplémentés avec des concentrés riches en glucides qui sont fermentés rapidement dans le rumen [41].

### 5.2. Culture embryonnaire

De nombreux facteurs, comme le temps d'interaction entre les gamètes ou la durée et les conditions de culture jouent un

rôle sur le rythme de développement et sur le sex-ratio des embryons de mammifères produits *in vitro* [72,73]. Chez les ruminants, l'évaluation cytogénétique des embryons produits *in vitro* a montré que la proportion de mâles et de femelles variait selon les conditions de culture utilisées, et en particulier la concentration en glucose du milieu [74,75]. Les embryons mâles ont tendance à se développer plus rapidement que les femelles et donc à arriver à des stades de développement plus avancés après les huit jours de culture utilisés couramment en production bovine [76]. Enfin, le stress maternel pourrait aussi largement influencer le sex-ratio [77].

Chez les ruminants, la supplémentation des milieux de culture avec différents lots de sérum induit des effets à long terme importants (syndrome du gros veau, avec augmentation du poids à la naissance et pertes périnatales) [74,78–80]. L'étude de 2288 veaux produits commercialement par FIV a montré une augmentation significative du syndrome du gros veau (3,2 % chez les veaux issus de FIV contre 0,7 % après insémination artificielle) [80]. De plus, l'incidence du syndrome du gros veau est largement augmentée lorsque les embryons sont produits par clonage somatique [81,82]. La comparaison de veaux produits après culture d'embryons dans un milieu avec ou sans sérum ou après culture *in vivo* dans l'oviducte ligaturé de brebis a montré que le poids à la naissance était significativement augmenté dans les deux groupes produits entièrement *in vitro* par rapport au groupe cultivé temporairement *in vivo* dans les oviductes de brebis [83]. L'analyse des transcrits de neuf gènes importants pour le développement à 12 jours (transporteurs de glucose, superoxyde dismutase, IGF-Ir...) a montré que cinq d'entre eux étaient surexprimés lors de culture *in vitro*. Des différences de profil d'expression des gènes entre les embryons bovins produits par fécondation *in vivo*, par fécondation *in vitro* ou par clonage ont été décrites [84]. Curieusement, cependant, le clonage affecte comparativement moins l'expression des gènes au stade blastocyste que la fécondation *in vitro* [85]. En revanche, la situation est inversée lorsqu'on analyse l'expression des gènes placentaires à terme [86].

## 6. Mécanismes

### 6.1. Épigenétique

Les mécanismes mis en jeu dans les effets décrits ci-dessus supposent l'altération de l'expression de gènes clés impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques comme le métabolisme du glucose, l'adipogénèse, la réponse aux corticoïdes et la fonction surrénalienne. Des modifications épigénétiques sont certainement mises en place, d'autant plus que de nombreuses modifications épigénétiques ont lieu durant l'ovogénèse et le développement embryonnaire précoce [87–89]. De plus, certains gènes sont plus susceptibles que d'autres aux variations de l'environnement. Chez la souris, une supplémentation en folates et autres donneurs de méthyle durant la gestation permet de changer le profil d'expression d'allèles sensibles à la méthylation chez la descendance [7–9,90]. Chez la brebis, l'administration d'un régime déficient

en groupements méthyle (carencé en vitamines B en en folates) durant la semaine qui précède et pendant six jours après la fécondation (date à laquelle les embryons étaient transférés dans des receveuses témoins) induit un excès de poids et d'adiposité chez les descendants une fois adultes. De plus, la réponse humorale est diminuée après vaccination au rotavirus à l'âge d'un an. Enfin, la pression artérielle est augmentée, les mâles étant plus affectés que les femelles. Le profil de méthylation est altéré dans 4 % des îlots CpG examinés dans le foie, et la majeure partie des sites altérés sont spécifiques aux mâles [91,92]. La méthylation de l'ADN n'est cependant certainement pas le seul mécanisme mis en cause puisque ce ne sont pas les modifications de la méthylation qui sont responsables des effets transgénérationnels observés chez la souris Agouti (*Agouti viable yellow*) [7].

### 6.2. Différenciation cellulaire

Les différences structurelles et fonctionnelles observées en fonction du régime maternel reflètent des régulations à court et à long terme de l'expression de gènes multiples. Certains des effets rapportés peuvent provenir d'influences endocrines ou nutritionnelles au moment de la gastrulation, comme les effets sur l'endocytose du sac vitellin rapportés par Watkins et al. [52]. Ainsi, des modifications précoces des cellules précurseurs des différents feuillettes pourraient entraîner des effets permanents sur la fonction des organes qui en sont dérivés.

## 7. Conclusion

Les données présentées ici montrent à travers de nombreuses exemples que les périodes pré- et périconceptionnelles sont très importantes pour la programmation d'effets à long terme chez le fœtus, puis chez l'adulte. Les milieux de maturation des ovocytes et de culture des embryons affectent certainement le développement de façon beaucoup plus importante que ce qu'on présupposait il y a quelques années. En tout état de cause, étant donné la variabilité des effets selon les espèces et selon les sexes, les effets à long terme des milieux utilisés pour l'Homme devraient être évalués sur plusieurs espèces animales, et de préférence pas seulement les espèces de laboratoire, avant que ceux-ci soient approuvés pour leur usage chez l'Homme.

## Références

- [1] Barker DJP, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235–9.
- [2] Gluckman PD, Hanson MA. The consequences of being born small - an adaptive perspective. *Horm Res* 2006;(65 Suppl. 3).
- [3] Edwards LJ, McMillen IC. Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R669–79.
- [4] Kumarasamy V, Mitchell MD, Bloomfield FH, Oliver MH, Campbell ME, Challis JRG, et al. Effects of periconceptional undernutrition on the initiation of parturition in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R67–72.
- [5] Kwong W, Wild A, Roberts P, Willis A, Fleming T. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes

- blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000;127:4195–202.
- [16] McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhauser BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: The role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:82–9.
  - [17] Blewitt ME, Vickaryous NK, Paldi A, Koseki H, Whitelaw E. Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PLoS Genet* 2006;2:e49.
  - [18] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089–93.
  - [19] Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63–8.
  - [20] Harding JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 2001;30:15–23.
  - [21] Buckley AJ, Jaquiere AL, Harding JE. Nutritional programming of adult disease. *Cell Tissue Res* 2005;322:73–9.
  - [22] Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004;71:1046–54.
  - [23] Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: New insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:90–3.
  - [24] Kind KL, Moore VM, Davies MJ. Diet around conception and during pregnancy – effects on fetal and neonatal outcomes. *Reprod Biomed Online* 2006;12:532–41.
  - [25] Sinclair KD, Singh R. Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo. *Theriogenology* 2007;67:43–53.
  - [26] Gunn RG, Sim DA, Hunter EA. Effects of nutrition in utero and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish backface ewes in two management systems. *Anim Sci* 1995;60:223–30.
  - [27] Mandon-Pepin B, Oustry-Vaiman A, Vigier B, Piumi F, Cribeu E, Cotinot C. Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. *Biol Reprod* 2003;68:985–95.
  - [28] Rhind SM. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:169–81.
  - [29] Ibanez L, Potau N, Ferrer A, Rodriguez-Hierro F, Marcos MV, De Zegher F. Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3391–3.
  - [30] Meikle D, Westberg M. Maternal nutrition and reproduction of daughters in wild house mice (*Mus musculus*). *J Reprod Fertil* 2001;122:437–42.
  - [31] Rae MT, Kyle CE, Miller DW, Hammond AJ, Brooks AN, Rhind SM. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci* 2002;72:63–71.
  - [32] Rhind SM, Elston DA, Jones JR, Rees ME, McMillen SR, Gunn RG. Effects of restriction of growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance. *Small Rumin Res* 1998;30:121–6.
  - [33] Rae MT, Rhind SM, Kyle CE, Miller DW, Brooks AN. Maternal undernutrition alters triiodothyronine concentrations and pituitary response to GnRH in fetal sheep. *J Endocrinol* 2002;173.
  - [34] Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Influence of placentally-mediated foetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction* 2001;122:375–83.
  - [35] Rae MT, Palassio S, Kyle CE, Brooks AN, Lea RG, Miller DW, et al. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *J Reprod Fertil* 2001;122:915–22.
  - [36] Lea RG, Andrade LP, Rae MT, Hannah LT, Kyle CE, Murray JF, et al. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *J Reprod Fertil* 2006;131:113–24.
  - [37] Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. Environmental influences on the fetus and neonate - timing, mechanisms of action and effects on subsequent adult function. *Domest Anim Endocrinol* 2003;25:3–11.
  - [38] Murdoch WJ. Metaplastic potential of p53 down-regulation in ovarian surface epithelial cells affected by ovulation. *Cancer Lett* 2003;191:75–81.
  - [39] Borwick SC, Rhind SM, McMillen SR, Racey PA. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:711–5.
  - [40] Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. *Placenta* 2003;24:248–57.
  - [41] Sir-Petermann T, Hitchensfeld C, Codner E, Maliqueo M, Iniguez G, Echiburru B, et al. Gonadal function in low birth weight infants: A pilot study. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007;20:405–14.
  - [42] Banos G, Brotherstone S, Coffey MP. Prenatal maternal effects on body condition score, female fertility, and milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci* 2007;90:3490–9.
  - [43] Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J Reprod Fertil* 1996;107.
  - [44] Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. *Reproduction* 2002;123:769–77.
  - [45] Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Ravelli ACJ, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:93–8.
  - [46] Lumey LH. Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944–1945. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1992;6:240–53.
  - [47] Khireddine B, Grimard B, Ponter AA, Ponsart C, Boudjenah H, Mialot JP, et al. Influence of flushing on LH secretion, follicular growth and the response to estrus synchronisation treatment in suckled beef cows. *Theriogenology* 1998;1409–21.
  - [48] Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Munoz-Gutierrez M, et al. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:339–54.
  - [49] Fouladi-Nashta AA, Gutierrez CG, Gong JG, Garnsworthy PC, Webb R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol Reprod* 2007;77:9–17.
  - [50] Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod* 2005;73:918–26.
  - [51] Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Mitchell LM, McEvoy TG. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim Feed Sci Technol* 2006;126:259–76.
  - [52] Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochov A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *J Reprod Fertil* 2001;121:447–54.
  - [53] Chavatte-Palmer P, Baron M, Servely JL, Laigre P, Fortun-Lamothe L, Renard JP. Effect of a hyperlipidic hypercholesterolemic diet in pubertal does on fetal and post-natal development. In: 33rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society; 2006; Cambridge, UK. Abstract 28, p. 67.
  - [54] Chavatte-Palmer P, Baron M, Servely JL, Laigre P, Picone O, Berthelot V, et al. Development of obesity in rabbit offspring from dams fed a hyperlipidic hypercholesterolemic diet. In: The Early Nutrition Programming & Health Outcomes in Later Life Conference; 2007; Budapest. Abstract.
  - [55] Wakefield SL, Lane M, Schulz SJ, Hebart ML, Thompson JG, Mitchell M. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E425–34.
  - [56] Watkins AJ, Wilkins A, Cunningham C, Perry VH, Seet MJ, Osmond C, et al. Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J Physiol Lond* 2008;586:2231–44.
  - [57] Edwards LJ, McMillen IC. Impact of maternal undernutrition during the periconceptual period, fetal number, and fetal sex on the development of

- the hypothalamo-pituitary adrenal axis in sheep during late gestation. *Biol Reprod* 2002;66:1562–9.
- [48] Gallaher BW, Breier BH, Keven CL, Harding JE, Gluckman PD. Fetal programming of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3: evidence for an altered response to undernutrition in late gestation following exposure to periconceptual undernutrition in the sheep. *J Endocrinol* 1998;159:501–8.
- [49] Oliver MH, Hawkins P, Harding JE. Periconceptual undernutrition alters growth trajectory and metabolic and endocrine responses to fasting in late-gestation fetal sheep. *Pediatr Res* 2005;57.
- [50] MacLaughlin SM, Walker SK, Kleemann DO, Sibbons JP, Tosh DN, Gentili S, et al. Impact of periconceptual undernutrition on adrenal growth and adrenal insulin-like growth factor and steroidogenic enzyme expression in the sheep fetus during early pregnancy. *Endocrinology* 2007;148:1911–20.
- [51] Gardner DS, Pearce S, Dandrea J, Walker R, Ramsay MM, Stephenson T, et al. Peri-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evoked baroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension* 2004;43:1290–6.
- [52] Watkins AJ, Ursell E, Panton R, Papenbrock T, Hollis L, Cunningham C, et al. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biol Reprod* 2008;78:299–306.
- [53] Leese HJ, Hugentobler SA, Gray SM, Morris DG, Sturmeier RG, Whitear SL, et al. Female reproductive tract fluids: Composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:1–8.
- [54] Ferguson EM, Leese HJ. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1195–201.
- [55] Martin KR, Barrett JC. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: Low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2002;21:71–5.
- [56] Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:43–52.
- [57] Agarwal A, Allamaneni S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2004;9:338–47.
- [58] Scholl TO, Leskiw M, Chen XH, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr* 2005;81.
- [59] Wang Y, Walsh SW. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 2001;22:206–12.
- [60] Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000;157:2111–22.
- [61] Sakamaki H, Akazawa S, Ishibashi M, Izumino K, Takino H, Yamasaki H, et al. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes* 1999;48:1138–44.
- [62] Garrel C, Fowler PA, Al-Gubory KH. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placenta. *Free Rad Res*: in press.
- [63] Cederberg J, Simán CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin D decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res* 2001;49:755–62.
- [64] Coffey MT, Britt JH. Enhancement of sow reproductive performance by B-carotene or vitamin A. *J Anim Sci* 1993;71:1198–202.
- [65] Pusateri AE, Diekman MA, Singleton WL. Failure of vitamin A to increase litter size in sows receiving injections at various stages of gestation. *J Anim Sci* 1999;77:1532–5.
- [66] Tarin JJ, Pérez-Albal S, Pertusa JF, Cano A. Oral administration of pharmacological doses of vitamins C and E reduces reproductive fitness and impairs the ovarian and uterine functions of female mice. *Theriogenology* 2002;57:1539–50.
- [67] Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992;18:1–29.
- [68] Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intakes of fruit and vegetables and risks of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2003;5:492–9.
- [69] Vouldoukis I, Conti M, Krauss P, Kamate C, Blazquez S, Tefit M, et al. Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytother Res* 2004;18:957–62.
- [70] Vouldoukis I, Lacañ D, Kamate C, Coste P, Calenda A, Mazier D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumis melo* LC extract rich in superoxide dismutase activity. *J Ethnopharmacol* 2004;94:67–75.
- [71] Peura TT, Kleemann DO, Rudiger SR, Natrass GS, McLaughlan CJ, Walker SK. Effect of nutrition of oocyte donor on the outcomes of somatic cell nuclear transfer in the sheep. *Biol Reprod* 2003;68:45–50.
- [72] McEvoy TG, Alink FM, Moreira VC, Watt RG, Powell KA. Embryo technologies and animal health - consequences for the animal following ovum pick-up, in vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2006;65:926–42.
- [73] Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, McEvoy TG. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum Reprod* 2000;15:68–86.
- [74] Gutiérrez-Adán A, Granados J, Pintado B, De la Fuente J. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVF/IVF embryos cultured in vitro. *J Reprod Fertil Dev* 2001;13:361–5.
- [75] Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2005;72:201–7.
- [76] Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1999;117:159–67.
- [77] Linklater WL. Translocation reverses birth sex ratio bias depending on its timing during gestation: evidence for the action of two sex-allocation mechanisms. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:831–9.
- [78] Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998;3:155–63.
- [79] van Wageningen-de Leeuw AM, Aerts BJG, den Haas JHG. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 1998;49:883–94.
- [80] van Wageningen-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos APW, Merton JS, den Haas JHG, Kemp B, et al. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 2000;53:575–97.
- [81] Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, et al. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 2002;66:1596–603.
- [82] Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;66:6–13.
- [83] Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 2002;67:767–75.
- [84] Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 2005;17:23–5.
- [85] Smith SL, Everts RE, Tian XC, Du F, Sung L-Y, Rodriguez-Zas SL, et al. Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *PNAS* 2005;102:17582–7.
- [86] Everts RE, Chavatte-Palmer P, Razzak A, Hue I, Green CA, Oliveira R, et al. Aberrant gene expression patterns in placentomes is associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiol Genomics* 2008;33:65–77.
- [87] Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:93–100.
- [88] Bettegowda A, Lee K-B, Smith GW. Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:45–53.
- [89] Bromfield J, Messamore W, Albertini DF. Epigenetic regulation during mammalian oogenesis. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:74–8.
- [90] Waterland RA. Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *J Nutr* 2003;133:238–1238.
- [91] Sinclair KD. Assisted reproductive technologies and pregnancy outcomes: Mechanistic insights from animal studies. *Semin Reprod Med* 2008;26:153–61.
- [92] Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptual B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19351–6.



## Références

1. BARKER DJ, ERIKSSON JG, FORSEN T, OSMOND C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235-9.
2. GLUCKMAN PD, HANSON MA. The consequences of being born small - an adaptive perspective. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:5-14.
3. HALES CN, BARKER DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
4. HARDING JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 2001;30:15-23.
5. BARKER DJ, OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986;1:1077-81.
6. BARKER DJ, CLARK PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod* 1997;2:105-12.
7. PAINTER RC, ROSEBOOM TJ, BLEKER OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 2005;20:345-52.
8. RODRIGUEZ A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *J Child Psychol Psychiatry* 2010;51:134-143.
9. BARKER DJ, OSMOND C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. *J Epidemiol Community Health* 1986;40:37-44.
10. PALINSKI W, NAPOLI C. Impaired Fetal Growth, Cardiovascular Disease, and the Need to Move on. *Circulation* 2008;117:341-434.
11. MEAS T, DEGHMOUN S, ARMOOGUM P, ALBERTI C, LEVY-MARCHAL C. Consequences of Being Born Small for Gestational Age on Body Composition: An 8-Year Follow-Up Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008:3804-3809.
12. KAIJSER M, BONAMY A, AKRE O, et al. Perinatal Risk Factors for Ischemic Heart Disease. Disentangling the Roles of Birth Weight and Preterm Birth. *Circulation* 2008;117:405-410.
13. PICONE O, SERVELY JL, CHAVATTE-PALMER P. [Developmental origin of human adult disease: which importance for obstetrical practice?]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2007;36:338-43.
14. BARKER DJ, OSMOND C, KAJANTIE E, ERIKSSON JG. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann Hum Biol* 2009;36:445-58.
15. ERIKSSON JG. Epidemiology, genes and the environment: lessons learned from the Helsinki Birth Cohort Study. *J Intern Med* 2007;261:418-25.
16. TUOVINEN S, RAIKKONEN K, KAJANTIE E, et al. Depressive symptoms in adulthood and intrauterine exposure to pre-eclampsia: the Helsinki Birth Cohort Study. *Bjog* 2010;117:1236-42.
17. LAHTI J, RAIKKONEN K, PESONEN AK, et al. Prenatal growth, postnatal growth and trait anxiety in late adulthood - the Helsinki Birth Cohort Study. *Acta Psychiatr Scand* 2010;121:227-35.
18. OSMOND C, KAJANTIE E, FORSEN TJ, ERIKSSON JG, BARKER DJ. Infant growth and stroke in adult life: the Helsinki birth cohort study. *Stroke* 2007;38:264-70.
19. KAJANTIE E, ERIKSSON JG, OSMOND C, THORNBURG K, BARKER DJ. Pre-eclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring: the Helsinki birth cohort study. *Stroke* 2009;40:1176-80.
20. KAJANTIE E, BARKER DJ, OSMOND C, FORSEN T, ERIKSSON JG. Growth before 2 years of age and serum lipids 60 years later: the Helsinki Birth Cohort study. *Int J Epidemiol* 2008;37:280-9.

21. HEUDE B, THIÉBAUGEORGES O, GOUA V, et al. Pre-Pregnancy Body Mass Index and Weight Gain During Pregnancy: Relations with Gestational Diabetes and Hypertension, and Birth Outcomes. *Matern Child Health J* 2011; [Epub ahead of print].
22. REGNAULT N, BOTTON J, FORHAN A, et al. Determinants of early ponderal and statural growth in full-term infants in the EDEN mother-child cohort study. *Am J Clin Nutr* 2010 92:594-602.
23. PAINTER RC, OSMOND C, GLUCKMAN PD, HANSON M, PHILLIPS DI, ROSEBOOM TJ. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *Br J Obstet Gynaecol* 2008;115:1243-1249.
24. ZAMBRANO E, MARTINEZ-SAMAYOA PM, BAUTISTA CJ, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005;566:225-36.
25. DRAKE AJ, WALKER BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol* 2004;180:1-16.
26. DRAKE AJ, WALKER BR, SECKL JR. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R34-8.
27. LUSSANA F, PAINTER RC, OCKE MC, BULLER HR, BOSSUYT PM, ROSEBOOM TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1648-52.
28. ARMITAGE JA, TAYLOR PD, POSTON L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 2005;565:3-8.
29. KHAN IY, TAYLOR PD, DEKOU V, et al. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 2003;41:168-75.
30. KHAN I, DEKOU V, HANSON M, POSTON L, TAYLOR P. Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 2004;110:1097-102.
31. GLUCKMAN PD, HANSON MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* 2004;56:311-7.
32. HOWIE GJ, SLOBODA DM, KAMAL T, VICKERS MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 2009;587:905-15.
33. SAMUELSSON A-M, MATTHEWS P, ARGENTON M, et al. Diet-Induced Obesity in Female Mice Leads to Offspring Hyperphagia, Adiposity, Hypertension, and Insulin Resistance. *Hypertension* 2008;51:383-392.
34. CHEN H, SIMAR D, LAMBERT K, MERCIER J, MORRIS MJ. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology* 2008;149:5348-56.
35. CHEN H, SIMAR D, MORRIS MJ. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS One* 2009;4:e6259.
36. McMILLEN IC, MACLAUGHLIN SM, MUHLHAUSLER BS, GENTILI S, DUFFIELD JL, MORRISON JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:82-9.
37. MACLAUGHLIN S, WALKER S, ROBERTS C, KLEEMAN D, McMILLEN IC. Periconceptual nutrition and the relationship between maternal body weight changes in the periconceptual period and fetoplacental growth in the sheep. *J Physiol* 2005;565:111-124.

38. KWONG WY, WILD AE, ROBERTS P, WILLIS AC, FLEMING TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000;127:4195-202.
39. WATKINS AJ, URSELL E, PANTON R, et al. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biol Reprod* 2008;78:299-306.
40. WATKINS AJ, WILKINS A, CUNNINGHAM C, et al. Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J Physiol* 2008;586:2231-44.
41. MALONEY C, HAY S, YOUNG L, SINCLAIR K, REES W. A Methyl-Deficient Diet Fed to Rat Dams during the Peri-Conception Period Programs Glucose Homeostasis in Adult Male but Not Female Offspring. *Journal of Nutrition* 2010:In Press.
42. DEAN W, SANTOS F, REIK W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:93-100.
43. BETTEGOWDA A, LEE KB, SMITH GW. Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:45-53.
44. BROMFIELD J, MESSAMORE W, ALBERTINI DF. Epigenetic regulation during mammalian oogenesis. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:74-80.
45. GODFREY M, SHEPPARD A, GLUCKMAN PD, et al. Epigenetic Gene Promoter Methylation at Birth Is Associated With Child's Later Adiposity. *Diabetes* 2011;60:1528-1534.
46. LIANG C, OEST M, PRATER M. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult onset chronic disease in C57BL/mice. *Birth Defects Res B Reprod Toxicol* 2009;86:377-384.
47. WU Q, SUZUKI M. Parental obesity and overweight affect the body-fat accumulation in the offspring: the possible effect of a high fat diet through epigenetic inheritance. *Obes Res* 2009;7:201-208.
48. NG S, LIN R, LAYBUTT D, BARRES R, OEN, JA., MORRIS, MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010;467:963-966.
49. SKINNER M, MANIKKAM M, GUERRO-BOSAGNA C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab* 2010;2010.
50. GUERRERO-BOSAGNA C, SKINNER M. Epigenetic transgenerational effects of endocrine disruptors on male reproduction. *Semin Reprod Med* 2009;27:403-408.
51. HAUMAITRE C, LENOIR OS, R. Histone deacetylase inhibitors modify pancreas cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol Cell Biol* 2008;28:6373-6383.
52. WATERLAND RA. Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *J Nutr* 2003;133:238; author reply 239.
53. BLEWITT ME, VICKARYOUS NK, PALDI A, KOSEKI H, WHITELAW E. Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PLoS Genet* 2006;2:e49.
54. REIK W, DEAN W, WALTER J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-93.
55. WATERLAND RA, JIRTLE RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63-8.
56. SINCLAIR KD. Assisted reproductive technologies and pregnancy outcomes: mechanistic insights from animal studies. *Semin Reprod Med* 2008;26:153-61.

57. SINCLAIR KD, ALLEGRUCCI C, SINGH R, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19351-6.
58. WATERLAND RA, DOLINOY D, LIN J, SMITH C, SHI X, TAILIANI K. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin fused. *Genesis* 2006;44:401-406.
59. CHARLES MA, ESCHWEGE E, BASDEVANT A. Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2182-6.
60. ASCHERIO A, KATAN MB, ZOCK PL, STAMPFER MJ, WILLETT WC. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1999;340:1994-8.
61. SPRECHER H, CHEN Q. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis: a microsomal-peroxisomal process. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999;60:317-21.
62. HANSSON GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
63. HANSSON G. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7:329-331.
64. YAMASHITA T, FREIGANG S, EBERLE C, et al. Maternal immunization programs postnatal immune responses and reduces atherosclerosis in offspring. *Circ Res* 2006;99:e51-64.
65. PALINSKI W, YAMASHITA T, FREIGANG S, NAPOLI C. Developmental programming: maternal hypercholesterolemia and immunity influence susceptibility to atherosclerosis. *Nutr Rev* 2007;65:S182-7.
66. CULLEN P, BAETTA R, BELLOSTA S, et al. Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:535-42.
67. FUSTER V, MORENO PR, FAYAD ZA, CORTI R, BADIMON JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:937-54.
68. HERRERA E, AMUSQUIVAR E, LOPEZ-SOLDADO I, ORTEGA H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:59-64.
69. HAGGARTY P, PAGE K, ABRAMOVICH DR, ASHTON J, BROWN D. Long-chain polyunsaturated fatty acid transport across the perfused human placenta. *Placenta* 1997;18:635-42.
70. HAGGARTY P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1559-70.
71. KAMP F, HAMILTON JA. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75:149-59.
72. CAMPBELL FM, BUSH PG, VEERKAMP JH, DUTTA-ROY AK. Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta* 1998;19:409-15.
73. KOLETZKO B, LARQUE E, DEMMELMAIR H. Placental transfer of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). *J Perinat Med* 2007;35 Suppl 1:S5-11.
74. HAGGARTY P, ALLSTAFF S, HOAD G, ASHTON J, ABRAMOVICH DR. Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. *Placenta* 2002;23:86-92.
75. LARQUE E, KRAUSS-ETSCHMANN S, CAMPOY C, et al. Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. *Am J Clin Nutr* 2006;84:853-61.
76. FOURNIER T, TSATSARIS V, HANDSCHUH K, EVAIN-BRION D. PPARs and the placenta. *Placenta* 2007;28:65-76.
77. HENDRICKSE W, STAMMERS JP, HULL D. The transfer of free fatty acids across the human placenta. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:945-52.
78. LAFOND J, MOUKDAR F, RIOUX A, et al. Implication of ATP and sodium in arachidonic acid incorporation by placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes in the human. *Placenta* 2000;21:661-9.

79. WELLS MY, DECOBECQ CP, DECOUVELAERE DM, JUSTICE C, GUITTIN P. Changes in clinical pathology parameters during gestation in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Pathol* 1999;27:370-9.
80. MIZOGUCHI Y, MATSUOKA T, MIZOGUCHI H, et al. Changes in blood parameters in New Zealand White rabbits during pregnancy. *Lab Anim* 2010;44:33-39.
81. MONTOUDIS A, SIMONEAU L, BRISSETTE L, FOREST JC, SAVARD R, LAFOND J. Impact of a cholesterol enriched diet on maternal and fetal plasma lipids and fetal deposition in pregnant rabbits. *Life Sci* 1999;64:2439-50.
82. MARSEILLE-TREMBLAY C, GRAVEL A, LAFOND J, C M. Effect of an enriched diet during pregnancy on fatty acid synthase, HMG-Coa reductase and SREBP-1/2 expression in rabbits. *Life Sci* 2007;81:772-778.
83. MONTOUDIS A, BOILEAU S, SIMONEAU L, LAFOND J. Impact of an enriched-cholesterol diet on enzymatic cholesterol metabolism during rabbit gestation. *Life Sci* 2003;73:1463-77.
84. BOGUSLAWSKI W, SOKOLOWSKI W. HMG-CoA reductase activity in the microsomal fraction from human placenta in early and term pregnancy. *Int J Biochem* 1984;16:1023-6.
85. SHI W, SWAN KF, LEAR SR, O'NEIL JS, ERICKSON SK, HENSON MC. Regulation of pathways determining cholesterol availability in the baboon placenta with advancing gestation. *Biol Reprod* 1999;61:1499-505.
86. PICONE O, MARSZALEK A, SERVELY JL, CHAVATTE-PALMER P. [Effects of omega 3 supplementation in pregnant women]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2009;38:117-24.
87. PICONE O, LAIGRE P, FORTUN-LAMOTHE L, et al. Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology* 2011.
88. NARAYANASWAMY M, WRIGHT KC, KANDARPA K. Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11:5-17.
89. LUNNEY JK. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* 2007;3:179-84.
90. LUGINBUHL H, PAULI B, RATCLIFFE HL. Atherosclerosis in swine and swine as a model for the study of atherosclerosis. *Adv Cardiol* 1974;13:119-26.
91. RICHARDSON M, DE RESKE M, DELANEY K, FLETCH A, WILCOX LH, KINLOUGH-RATHBONE RL. Respiratory infection in lipid-fed rabbits enhances sudanophilia and the expression of VCAM-1. *Am J Pathol* 1997;151:1009-17.
92. RUSSELL JC, PROCTOR SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2006;15:318-30.
93. BOZOKY Z, BALOGH L, MATHE D, FULOP L, JANOKI GA. Evaluation of rat and rabbit sera lipoproteins in experimentally induced hyperlipidemia by analytical ultracentrifugation. *Eur Biophys J* 2006;35:205-13.
94. DAUGHERTY A. Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 2002;323:3-10.
95. BROUSSEAU ME, HOEG JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res* 1999;40:365-75.
96. JOHNSON GJ, GRIGGS TR, BADIMON L. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1999;81:835-43.
97. GERRITY RG, NATARAJAN R, NADLER JL, KIMSEY T. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes* 2001;50:1654-65.

98. NAPOLI C, WITZTUM JL, CALARA F, DE NIGRIS F, PALINSKI W. Maternal hypercholesterolemia enhances atherogenesis in normocholesterolemic rabbits, which is inhibited by antioxidant or lipid-lowering intervention during pregnancy: an experimental model of atherogenic mechanisms in human fetuses. *Circ Res* 2000;87:946-52.
99. LI J, FOOTE RH, LIU Z, GILES JR. Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology* 1997;47:1103-13.
100. KIDDER JD, ROBERTS PJ, SIMKIN ME, FOOTE RH, RICHMOND ME. Nonsurgical collection and nonsurgical transfer of preimplantation embryos in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *J Reprod Fertil* 1999;116:235-42.
101. HULOT F, MARIANA JC, LEBAS F. [Establishment of puberty in the doe rabbit (folliculogenesis and ovulation. Effect of rationing the diet)]. *Reprod Nutr Dev* 1982;22:439-53.
102. DUFY-BARBE L, FRANCHIMONT P, FAURE JM. Time-courses of LH and FSH release after mating in the female rabbit. *Endocrinology* 1973;92:1318-21.
103. REES DAVIES R, REES DAVIES J. Rabbit gastrointestinal physiology. *Vet Clin Exot Anim* 2003;6:139-153.
104. RANWEZ V, DELSUC F, RANWEZ S, BELKHIR K, TILAK MK, DOUZERY EJ. OrthoMaM: a database of orthologous genomic markers for placental mammal phylogenetics. *BMC Evol Biol* 2007;7:241.
105. HAJJOUBI S, RIVAL-GERVIER S, HAYES H, et al. Ruminants genome no longer contains Whey Acidic Protein gene but only a pseudogene. *Gene* 2006;370:104-12.
106. SCHULTZ RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 1993;15:531-8.
107. BRAUDE P, BOLTON V, MOORE S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;332:459-61.
108. MANES C. The participation of the embryonic genome during early cleavage in the rabbit. *Dev Biol* 1973;32:453-9.
109. SAGATA N, WATANABE N, VANDE WOUDE GF, IKAWA Y. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 1989;342:512-8.
110. TANG F, KANEDA M, O'CARROLL D, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007;21:644-8.
111. JEANBLANC M, SALVAING J, MASON K, DEBEY P, BEAUJEAN N. Embryonic genome activation. *Gynecol Obstet Fertil* 2008;36:1126-1132.
112. HAAF T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;310:13-22.
113. BELLIER S, CHASTANT S, ADENOT P, VINCENT M, RENARD JP, BENSAUDE O. Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. *Embo J* 1997;16:6250-62.
114. CHRISTIANS E, RAO VH, RENARD JP. Sequential acquisition of transcriptional control during early embryonic development in the rabbit. *Dev Biol* 1994;164:160-72.
115. MALLASINE A, TARRADE A, GUIBOURDENCHE J, ROCHETTE-EGLY C, EVAIN-BRION D. Le Placenta. *Medecine et Sciences* 2000;16:329-335.
116. BRINSTER RL, THOMSON JL. Development of eight-cell mouse embryos in vitro. *Exp Cell Res* 1966;42:308-15.

117. CHI MM, MANCHESTER JK, YANG VC, CURATO AD, STRICKLER RC, LOWRY OH. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biol Reprod* 1988;39:295-307.
118. KANE MT. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol Reprod* 1987;37:775-8.
119. BRINSTER RL. Culture of two-cell rabbit embryos to morulae. *J Reprod Fertil* 1970;21:17-22.
120. QUINN P, WALES RG. The in vitro metabolism of (U-14C)glucose by the preimplantation rabbit embryo. *Aust J Biol Sci* 1973;26:653-67.
121. MANES C, DANIEL JC, JR. Quantitative and qualitative aspects of protein synthesis in the preimplantation rabbit embryo. *Exp Cell Res* 1969;55:261-8.
122. BIGGERS JD, MCGINNIS LK, RAFFIN M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 2000;63:281-93.
123. ENDERS AC, BLANKENSHIP TN. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;38:3-15.
124. LEE MI, OAKES GK, LAM R, HOBEL CJ. The rabbit: a suitable model for investigation of vascular responsiveness during pregnancy. *Clin Exp Hypertens B* 1982;1:429-39.
125. MCADRLE A, DENTON K, MADUWEGEDERA D, MORITZ K, FLOWER R, CT R. Ontogeny of placental structural development and expression of the renin-angiotensin and 11B-HSD2 genes in the rabbit. *Placenta* 2009;30:590-598.
126. BEAUDOIN S, BARBET P, BARGY F. Developmental stages in the rabbit embryo: guidelines to choose an appropriate experimental model. *Fetal Diagn Ther* 2003;18:422-7.
127. CHAVATTE-PALMER P, LAIGRE P, SIMONOFF E, CHESNE P, CHALLAH-JACQUES M, RENARD JP. In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. *Theriogenology* 2008;69:859-69.
128. POLISCA A, SCOTTI L, ORLANDI R, BRECCHIA G, BOITI C. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in rabbits. *Theriogenology* 2010;73:358-366.
129. LEANDRI RD, ARCHILLA C, BUI LC, et al. Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiol Genomics* 2009;36:98-113.
130. GONZALEZ-MARISCAL G, DIAZ-SANCHEZ V, MELO AI, BEYER C, ROSENBLATT JS. Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiol Behav* 1994;55:1081-9.
131. KONDO T, WATANABE Y. A heritable hyperlipemic rabbit. *Jikken Dobutsu* 1975;24:89-94.
132. WATANABE Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 1980;36:261-8.
133. FINKING G, HANKE H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997;135:1-7.
134. DAVIGNON J, ROY M. Familial hypercholesterolemia in French-Canadians: taking advantage of the presence of a "founder effect". *Am J Cardiol* 1993;72:6D-10D.
135. MORTENSEN A, FRANSEN H. Reproductive performance and changes in blood lipids in breeding females and in growing Watanabe heritable hyperlipidaemic and New Zealand White rabbits. *Lab Anim* 1996;30:252-9.
136. SHIOMI M, ITO T, Y. W. Effects of hyperlipidemia on the nursing ability of WHHL rabbits. *Laboratory Animal Science* 1987;37:84-88.

137. MUNILLA MA, HERRERA E. A cholesterol-rich diet causes a greater hypercholesterolemic response in pregnant than in nonpregnant rats and does not modify fetal lipoprotein profile. *J Nutr* 1997;127:2239-45.
138. MONTOUDIS A, SIMONEAU L, LAFOND J. Influence of a maternal cholesterol-enriched diet on [1-14C]-linoleic acid and L-[4, 5-3H]-leucine entry in plasma of rabbit offspring. *Life Sci* 2004;74:1751-62.
139. NAPOLI C, D'ARMIENTO FP, MANCINI FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680-90.
140. ZILVERSMIT DB, REMINGTON M, HUGHES LB. Fetal growth and placental permeability in rabbits fed cholesterol. *J Nutr* 1972;102:1681-7.
141. PALINSKI W, D'ARMIENTO FP, WITZTUM JL, et al. Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ Res* 2001;89:991-6.
142. JEON SM, PARK YB, KWON OS, et al. Vitamin E supplementation alters HDL-cholesterol concentration and paraoxonase activity in rabbits fed high-cholesterol diet: comparison with probucol. *J Biochem Mol Toxicol* 2005;19:336-46.
143. LITTELL RC, HENRY PR, AMMERMAN CB. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci* 1998;76:1216-31.
144. EVANS RG, MADDEN AC, DENTON KM. Diversity of responses of renal cortical and medullary blood flow to vasoconstrictors in conscious rabbits. *Acta Physiol Scand* 2000;169:297-308.
145. DENTON KM, FLOWER RL, STEVENSON KM, ANDERSON WP. Adult rabbit offspring of mothers with secondary hypertension have increased blood pressure. *Hypertension* 2003;41:634-9.
146. GILES JR, FOOTE RH. Rabbit blastocysts: allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm. *Molecular Reproduction and Development* 1995;41:204-211.
147. DIDIER G, BREZELLE P, REMY E, HENAUT A. GeneANOVA--gene expression analysis of variance. *Bioinformatics* 2002;18:490-1.
148. MAMO S, GAL A, POLGAR Z, DINNYES A. Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology* 2008;9:67.
149. BUI LC, EVSIKOV AV, KHAN DR, et al. Retrotransposon expression as a defining event of genome reprogramming in fertilized and cloned bovine embryos. *Reproduction* 2009;138:289-99.
150. SESSLER AM, NTAMBI JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Nutr* 1998;128:923-6.
151. AKINGBEMI BT, BRADEN TD, KEMPPAINEN BW, et al. Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular Leydig cells in the adult rat. *Endocrinology* 2007;148:4475-88.
152. IGOSHEVA N, ABRAMOV AY, POSTON L, et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One* 2010;5:e10074.
153. CARDOZO E, PAVONE ME, HIRSHFELD-CYTRON JE. Metabolic syndrome and oocyte quality. *Trends Endocrinol Metab*;22:103-9.
154. ROBKER RL, AKISON LK, BENNETT BD, et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1533-40.
155. WALLACE JM, AITKEN RP, MILNE JS, HAY WW, JR. Nutritionally mediated placental growth restriction in the growing adolescent: consequences for the fetus. *Biol Reprod* 2004;71:1055-62.

156. DAMM P, HANDBERG A, KUHLE C, BECK-NIELSEN H, MOLSTED-PEDERSEN L. Insulin receptor binding and tyrosine kinase activity in skeletal muscle from normal pregnant women and women with gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1993;82:251-9.
157. BUCHANAN TA, XIANG AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005;115:485-91.
158. BARBOUR LA, MCCURDY CE, HERNANDEZ TL, KIRWAN JP, CATALANO PM, FRIEDMAN JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S112-9.
159. MARSEILLE-TREMBLAY C, ETHIER-CHIASSON M, FOREST JC, et al. Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. *Mol Reprod Dev* 2008;75:1054-62.
160. ETHIER-CHIASSON M, FOREST JC, GIGUERE Y, et al. Modulation of placental protein expression of OLR1: implication in pregnancy-related disorders or pathologies. *Reproduction* 2008;136:491-502.
161. WANG X, REAPE TJ, LI X, et al. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. *FEBS Lett* 1999;462:145-50.
162. JONES H, WOOLLETT L, BARBOUR N, POWELL T, JANSSON Y. High fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J* 2009;23:2716-278.
163. FLEMING TP, KWONG WY, PORTER R, et al. The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004;71:1046-54.
164. SJOBLOM C, ROBERTS CT, WIKLAND M, ROBERTSON SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology* 2005;146:2142-53.
165. MALONEY CA, REES WD. Gene-nutrient interactions during fetal development. *Reproduction* 2005;130:401-10.
166. VICKERS MH, GLUCKMAN PD, COVENY AH, et al. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005;146:4211-6.
167. OZIL JP, BANREZES B, TOTTH S, SCHULTZ RM. Ca<sup>2+</sup> oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev Biol* 2006;300:534-544.
168. MISE H, YURA S, ITOH H, et al. The relationship between maternal plasma leptin levels and fetal growth restriction. *Endocr J* 2007;54:945-51.
169. KOROTKOVA M, GABRIELSSON B, LONN M, HANSON LA, STRANDVIK B. Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to alpha-linolenic acid in the maternal diet. *J Lipid Res* 2002;43:1743-9.
170. HALES CN, DESAI M, OZANNE SE, CROWTHER NJ. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans* 1996;24:341-50.
171. HALES CN, OZANNE SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol* 2003;547:5-10.
172. JENNINGS BJ, OZANNE SE, DORLING MW, HALES CN. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *FEBS Lett* 1999;448:4-8.
173. ERIKSSON JG, FORSEN T, TUOMILEHTO J, WINTER PD, OSMOND C, BARKER DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *Bmj* 1999;318:427-31.
174. FORSEN T, ERIKSSON J, TUOMILEHTO J, REUNANEN A, OSMOND C, BARKER D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 2000;133:176-82.

175. LEON DA, KOUPILOVA I, LITHELL HO, et al. Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 year old Swedish men. *Bmj* 1996;312:401-6.
176. ONG KK, AHMED ML, EMMETT PM, PREECE MA, DUNGER DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Bmj* 2000;320:967-71.
177. JAQUET D, DEGHMOUN S, CHEVENNE D, COLLIN D, CZERNICHOW P, LEVY-MARCHAL C. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia* 2005;48:849-55.
178. IBANEZ L, SUAREZ L, LOPEZ-BERMEJO A, DIAZ M, VALLS C, DE ZEGHER F. Early development of visceral fat excess after spontaneous catch-up growth in children with low birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:925-8.
179. IBANEZ L, LOPEZ-BERMEJO A, SUAREZ L, MARCOS MV, DIAZ M, DE ZEGHER F. Visceral adiposity without overweight in children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2079-83.
180. BELTRAND J, NICOLESCU R, KAGUELIDOU F, et al. Catch-up growth following fetal growth restriction promotes rapid restoration of fat mass but without metabolic consequences at one year of age. *PLoS One* 2009;4:e5343.
181. JUNGHEIM ES, SCHOELLER EL, MARQUARD KL, LOUDEN ED, SCHAFFER JE, MOLEY KH. Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. *Endocrinology* 2010;151:4039-4046.
182. O'REGAN D, KENYON C, SECKL J, HOLMES MC. Prenatal dexamethasone "progammas" hypotension, but stressed-induced hypertension in adult offspring. *J Endocrinol* 2008;196:343-352.
183. GLUCKMAN PD, HANSON MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med* 2007;261:461-71.
184. NAPOLI C, GLASS CK, WITZTUM JL, DEUTSCH R, D'ARMIENTO FP, PALINSKI W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 1999;354:1234-41.
185. JIANG HP, SERRERO G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7856-60.
186. KIKUCHI K, EKWALL H, TIENHAI P, et al. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote* 2002;10:355-66.
187. ABE H, YAMASHITA S, SATOH T, HOSHI H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57-66.
188. CERMELLI S, GUO Y, GROSS SP, WELTE MA. The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr Biol* 2006;16:1783-95.
189. MIURA S, GAN JW, BRZOSTOWSKI J, et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 2002;277:32253-7.
190. ORLICKY DJ, DEGALA G, GREENWOOD C, BALES ES, RUSSELL TD, MCMANAMAN JL. Multiple functions encoded by the N-terminal PAT domain of adipophilin. *J Cell Sci* 2008;121:2921-9.
191. GROSS DN, MIYOSHI H, HOSAKA T, et al. Dynamics of lipid droplet-associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin. *Mol Endocrinol* 2006;20:459-66.

192. XU G, SZTALRYD C, LU X, et al. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem* 2005;280:42841-7.
193. WOLINS NE, QUAYNOR BK, SKINNER JR, et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 2006;55:3418-28.
194. BLANCHETTE-MACKIE EJ, DWYER NK, BARBER T, et al. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 1995;36:1211-26.
195. ROBENEK H, HOFNAGEL O, BUERS I, ROBENEK MJ, TROYER D, SEVERS NJ. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci* 2006;119:4215-24.
196. SCOW RO, BLANCHETTE-MACKIE EJ, SMITH LC. Transport of lipid across capillary endothelium. *Fed Proc* 1980;39:2610-7.
197. COHEN AW, RAZANI B, SCHUBERT W, et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 2004;53:1261-70.
198. WOLINS NE, SKINNER JR, SCHOENFISH MJ, TZEKOV A, BENSCH KG, BICKEL PE. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem* 2003;278:37713-21.
199. WOLINS NE, QUAYNOR BK, SKINNER JR, SCHOENFISH MJ, TZEKOV A, BICKEL PE. S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:19146-55.
200. BRASAEMLE DL, DOLIOS G, SHAPIRO L, WANG R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2004;279:46835-42.
201. GRANNEMAN JG, LI P, LU Y, TILAK J. Seeing the trees in the forest: selective electroporation of adipocytes within adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E574-82.
202. MARCINKIEWICZ A, GAUTHIER D, GARCIA A, BRASAEMLE DL. The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem* 2006;281:11901-9.
203. YAMAGUCHI T, OMATSU N, MORIMOTO E, et al. CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res* 2007;48:1078-89.
204. GAO J, SERRERO G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem* 1999;274:16825-30.
205. IMAMURA M, INOGUCHI T, IKUYAMA S, et al. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E775-83.
206. LARIGAUDERIE G, FURMAN C, JAYE M, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:504-10.
207. LARIGAUDERIE G, CUAZ-PEROLIN C, YOUNES AB, et al. Adipophilin increases triglyceride storage in human macrophages by stimulation of biosynthesis and inhibition of beta-oxidation. *Febs J* 2006;273:3498-510.
208. MAGNUSSON B, ASP L, BOSTROM P, et al. Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1566-71.
209. BINNS D, JANUSZEWSKI T, CHEN Y, et al. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol* 2006;173:719-31.
210. GROSS SP, WELTE MA, BLOCK SM, WIESCHAUS EF. Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch controls travel distance. *J Cell Biol* 2000;148:945-56.

211. VALETTI C, WETZEL DM, SCHRADER M, et al. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* 1999;10:4107-20.
212. WELTE MA, GROSS SP, POSTNER M, BLOCK SM, WIESCHAUS EF. Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell* 1998;92:547-57.
213. ROTHWELL JE, ELPHICK MC. Lipoprotein lipase activity in human and guinea-pig placenta. *J Dev Physiol* 1982;4:153-9.
214. SHAFRIR E, BARASH V. Placental function in maternal-fetal fat transport in diabetes. *Biol Neonate* 1987;51:102-12.
215. KAMINSKY S, SIBLEY CP, MARESH M, THOMAS CR, D'SOUZA SW. The effects of diabetes on placental lipase activity in the rat and human. *Pediatr Res* 1991;30:541-3.
216. CAMPBELL FM, TAFFESSE S, GORDON MJ, DUTTA-ROY AK. Plasma membrane fatty-acid-binding protein in human placenta: identification and characterization. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:1011-7.
217. DUTTA-ROY AK. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr* 2000;71:315S-22S.
218. BILDIRICI I, ROH CR, SCHAIFF WT, LEWKOWSKI BM, NELSON DM, SADOVSKY Y. The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma/retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:6056-62.
219. HAGGARTY P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth--a review. *Placenta* 2002;23 Suppl A:S28-38.
220. TOBIN KA, HARSEM NK, DALEN KT, STAFF AC, NEBB HI, DUTTARROY AK. Regulation of ADRP expression by long-chain polyunsaturated fatty acids in BeWo cells, a human placental choriocarcinoma cell line. *J Lipid Res* 2006;47:815-23.
221. INNIS SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr* 2003;143:S1-8.
222. HERRERA E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 2002;19:43-55.
223. CHAVATTE-PALMER P, AL GUBORY K, PICONE O, HEYMAN Y. [Maternal nutrition: effects on offspring fertility and importance of the periconceptional period on long-term development]. *Gynecol Obstet Fertil* 2008;36:920-9.

## Abstract

The prevalence of human health problems associated with high-fat diets continues to rise, as does the number of such problems known to be associated with this diet. Disruption of the fetal environment induces in progeny a greater susceptibility to developing diseases in adulthood (DOHAD: Developmental Origins of Health and Disease). The objective of the work for this thesis was to assess in rabbits the consequences of a high-cholesterol and high-fat diet on embryonic and fetal development and on the onset of metabolic disorders in the long term. We fed rabbits ad libitum with a high-cholesterol (0.2%) and high-fat (8%) (HH) diet or a control (C) diet, starting at the age of 10 (experiment 1) or 18 weeks (age at which reproduction began, experiment 2). The litters were balanced at birth, and crossings were performed to differentiate the effect of the mother's food during gestation and during lactation. Accordingly, rabbits born to HH mothers were nursed by C (HH-C group) or HH (HH-HH) mothers and those born to C mothers were nursed either by C (C-C) or HH (C-HH) mothers.

During experiment 1, ultrasound clearly showed significant intrauterine growth restriction (IUGR) beginning at 9 days of gestation in the HH group ( $P < 0.05$ ). At birth, these rabbits weighed significantly less than their C counterparts ( $P < 0.05$ ). Because of their rapid weight catch-up, the significant difference had disappeared at weaning. All the rabbits thereafter received control food distributed ad libitum. At D176, there was no difference in weight between the HH-HH and HH-C groups but the animals in both these groups were significantly heavier than those in the C-C and C-HH groups ( $P < 0.05$ ). Moreover, blood pressure was higher in the HH-HH group than in any of the other groups ( $P < 0.05$ ). These physiological effects were not observed during experiment 2.

Because the physiological effects were observed only when the diet began before gestation, we hypothesized that the early maternal environment been modified, a change that resulted in disruption of embryo development with long-term consequences. We then used a specially designed chip to study gene expression at the maternal to embryonic transition. Transcriptomic analysis suggested that some transcripts were present in different quantities. We showed with qRT-PCR that the HH diet induced a transient augmentation in the quantity of adipophilin transcripts (present at D2 but not at D5.5). The immunohistochemical analysis on D5.5 showed a higher quantity of lipid droplets localized near the nucleus of embryos from mothers fed with the HH diet than in embryos of control mothers.

These results illustrate the importance of nutrition before and during pregnancy in the determination of in utero and postnatal growth as well as in the development of metabolic diseases over the long term. Maternal nutrition before conception can engender modifications in gene expression at the moment of the maternal to embryonic transition.

Key words: Fetal origins of adult disease, Gestation, High-fat diet, Ultrasound, PCR, Adipophilin

## Résumé

Les problèmes de santé liés à l'alimentation hyperlipidique chez l'humain sont en constante progression. Or, une perturbation de l'environnement fœtal induit chez la descendance une susceptibilité plus grande à développer des maladies à l'âge adulte (DOHAD : Developmental Origins of Health and Disease). L'objectif de ce travail de Thèse est d'évaluer, chez le lapin, les conséquences d'une alimentation hypercholestérolémique et hyperlipidique sur le développement embryonnaire, fœtal, et la survenue de troubles métaboliques à long terme.

Nous avons nourri des lapines ad libitum avec un régime hypercholestérolémique (0,2%) et hyperlipidique (8%) (HH) ou un régime témoin (C) à partir de l'âge de 10 (expérience 1) ou de 18 semaines (âge de la mise à la reproduction, expérience 2). A la naissance, les portées ont été équilibrées et des croisements effectués pour différencier l'effet de l'alimentation de la mère pendant la gestation et pendant la lactation. Ainsi des lapereaux nés de mères HH ont été allaités par des mères C (groupe HH-C) ou HH (groupe HH-HH) et des lapereaux nés de mère C ont été allaités par des mères C (groupe C-C) ou HH (groupe C-HH).

Au cours de l'expérience 1, un retard de croissance intra utérin (RCIU) significatif a été mis en évidence dès 9 jours de gestation par échographie dans le groupe HH ( $P < 0,05$ ). A la naissance, les lapereaux étaient significativement plus légers ( $P < 0,05$ ). En raison d'un rattrapage pondéral rapide, il n'existait plus de différence significative au sevrage. Tous les lapins ont alors reçu un aliment témoin distribué ad libitum. A J176, il n'y avait pas de différence de poids entre les groupes HH-HH et HH-C, mais les animaux de ces deux groupes étaient significativement plus lourds que les groupes C-C and C-HH ( $P < 0,05$ ). De plus, la tension artérielle était plus élevée dans le groupe HH-HH par rapport à tous les autres groupes ( $P < 0,05$ ). Au cours de l'expérience 2, de tels effets physiologiques n'ont pas été observés.

Les effets physiologiques n'ayant été observés que lorsque le régime avait été commencé avant la gestation, nous avons émis l'hypothèse que l'environnement maternel précoce avait été modifié, entraînant une perturbation du développement embryonnaire à l'origine des conséquences à long terme. L'expression des gènes au moment de la mise en route du génome embryonnaire a été étudié à l'aide d'une puce dédiée. L'analyse transcriptomique a permis de suggérer que certains transcrits étaient présents en quantités différentes. Nous avons montré par qRT-PCR que le régime HH induit une augmentation transitoire de la quantité de transcrit de l'adipophiline (présente à J2 mais pas à J5,5). L'analyse immunohistochimique montre une quantité plus importante de gouttelettes lipidiques localisées près du noyau dans les embryons issus de mères nourries par le régime HH à J5,5 comparé aux témoins.

Ces résultats illustrent l'importance de la nutrition avant et pendant la gestation pour la détermination de la croissance in utero et postnatale, ainsi que pour le développement de maladies métaboliques à long terme. La nutrition maternelle avant la gestation peut engendrer des modifications d'expression de gènes au moment de la transmission materno embryonnaire.

Mots clés : origine fœtale des maladies de l'adulte, Gestation, Alimentation hyperlipidique, Echographie, PCR, Adipophiline