

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR MÉDECINE et TECHNIQUES MÉDICALES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ (502)

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Impact d'une supplémentation périnatale en donneurs de méthyl sur les mécanismes physiologiques et épigénétiques de la programmation nutritionnelle chez le rat

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie
Spécialité : Biologie moléculaire, physiologie et nutrition

Présentée et soutenue publiquement par

Fanny GIUDICELLI

Le 30 septembre 2013, devant le jury ci-dessous :

Président : Pr. Dominique DARMAUN (INRA, Nantes, France)
Rapporteurs : Pr. Jamileh MOVASSAT (Université Diderot, Paris, France)
Dr. Christine LEROUX (INRA, St Genès Champanelle, France)
Examinatrice : Dr. Hélène JAMMES (INRA, Jouy-en-Josas, France)
Directrices de thèse : Dr. Valérie AMARGER (INRA, Nantes, France)
Dr. Patricia PARNET (INRA, Nantes, France)

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	4
INTRODUCTION.....	6
I- LA PROGRAMMATION NUTRITIONNELLE.....	7
1- <i>Obésité, diabète, maladies cardiovasculaires : Le syndrome métabolique un enjeu mondial.....</i>	7
2- <i>(Dé)Nutrition périnatale et programmation.....</i>	12
a- Evidence épidémiologique entre poids de naissance et pathologies à l'âge adulte	12
a-1- Faible poids de naissance	12
a-2- Faible poids de naissance et maladies cardiovasculaires.....	14
a-3- Poids de naissance / rattrapage de croissance et pression artérielle.....	15
b- L'hypothèse du « thrifty phenotype »	15
c- Les modèles d'étude	18
c-1 La restriction calorique maternelle	19
c-2- La restriction protéique maternelle	19
c-3- Le régime hyper-protéique maternel	21
c-4- La ligature des artères utérines.....	22
c-5- Le régime hyper-lipidique maternel (high-fat).....	22
c-6- La suralimentation par réduction de portée.....	23
II- PHYSIOPATHOLOGIE DU SYNDROME METABOLIQUE	24
1- <i>Les mécanismes physiologiques du syndrome métabolique et de la programmation nutritionnelle</i>	<i>24</i>
a- Programmation nutritionnelle d'organes clés impliqués dans le SM	24
a-1- Le pancréas	25
a-2- Le rein.....	25
a-3- Le foie.....	27
a-4- Le muscle.....	28
a-5- Le système nerveux central	29
a-6- Le tissu adipeux	31
b. Les mécanismes physiologiques du syndrome métabolique.....	32
b- 1 Le tissu adipeux	32
b- 2 La résistance à l'insuline.....	34
b- 3 La fonction endocrine du tissu adipeux.....	35
2- <i>Les mécanismes moléculaires de la programmation nutritionnelle</i>	<i>37</i>
a- Les 1 ^{ères} preuves d'un lien entre nutrition et modifications épigénétiques.....	38
b- Lien entre nutrition, méthylation et mécanismes physiologiques.....	41
c- Lien entre nutrition, méthylation et gènes soumis à l'empreinte parentale.....	43
3- <i>Les besoins en micronutriments liés à la grossesse : Quels nutriments ont un effet sur la régulation épigénétique ?.....</i>	<i>46</i>
a- L'acide folique.....	48
b- Méthionine	50
c- Choline et bétaine.....	51
d- Zinc	53
e- Vitamines B2, 6 et 12	54

4- Supplémentation avec de multiples donneurs de méthyl	55
ENCADRÉS	57
OBJECTIFS ET MODÈLE D'ÉTUDE	66
OBJECTIFS	67
MODELE D'ETUDE	68
RÉSULTATS	71
ARTICLE 1	72
<i>Excess of methyl donor in the perinatal period reduces postnatal leptin secretion in rat and interacts with the effect of protein content in diet.</i>	72
ARTICLE 2	72
<i>Excess of methyl donors in maternal diet affects postnatal down regulation of Igf2 and H19 in liver</i>	74
EXPÉRIENCE COMPLÉMENTAIRE : MEDIP SEQUENCING	74
DISCUSSION	80
CONCLUSION GÉNÉRALE	101
BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AgRP	Agouti-related protein
AQR	Apports Quotidiens Recommandés
ARC	Noyau arqué
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP III	Adult Treatment Panel III
BHMT	bétaïne-homocystéine méthyltransférase
C	Groupe contrôle
CART	Cocaine and amphetamine Regulated Transcript
Cdkn1c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
CEI	Communauté des Etats indépendants
Csup	Groupe contrôle supplémenté en donneurs de méthyl
CTCF	CCCTC-binding factor
DFTN	Défaut de fermeture du tube neural
Dlk1	Delta-Like 1 Homolog
DM	Donneur de methyl
DMH	Noyau dorsomédian
DMR	Differentially Methylated Regions
DNMT	ADN méthyltransférases
ECO	Europe centrale et orientale
FDA	Food and Drug Administration
Gnas	Guanine nucleotide binding protein alpha stimulating
GR	Glucocorticoïdes
Grb10	Growth factor receptor-bound protein 10
GSE	Gènes soumis à l'empreinte parentale
Gtl2	= Meg3 Maternally Expressed 3
Hcy	homocystéine
HDAC	Histone deacétylase
HDL	High density lipoprotein
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor-4
ICR	Imprinting Control Region
IDF	International Diabetes Federation
IGF2	Insulin-like growth factor 2
Igf2R	Insulin-like growth factor 2 receptor
IMC	Indice masse corporelle
KO	Knock out
LDL	Low density lipoprotein
LHA	Aire hypothalamique latérale
MBD	Methyl-binding domain
ME	Eminence médiane
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
MeDIP	Methylated DNA immunoprecipitation
Mest	Mesoderm Specific Transcript
MTHFR	Méthylentetrahydrofolate réductase
NCEP	National Cholesterol Education Program
NCEP	National Cholesterol Education

NIH	National Institute of Health
NPV	Noyau paraventriculaire
NPY	Neuropeptide Y
OC	Chiasma optique
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Pression artérielle
PAD	Pression artérielle diastolique
PAS	Pression artérielle systolique
Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PGC	Primordial germ cell
PNNS	Programme National Nutrition Santé
POMC	propiomelanocortine
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR δ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pref-1	Preadipocyte factor 1
PVN	Noyau paraventriculaire
R	Groupe restreint en protéines
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RP	restriction protéique
Rsup	Groupe restreint en protéine supplémenté en donneurs de méthyl
SAH	S-Adenosyl-L-homocysteine
SAHH	S-adénosylhomocystéine hydrolase
SAM	S-adénosylméthionine
SCN	Noyau suprachiasmatique
SLC38a4	Solute carrier family 38, member 4
SM	Syndrome métabolique
SNC	Système nerveux central
SPV	Zone subparaventriculaire
TA	Tissu Adipeux
TG	Triglycéride
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VMH	Noyau ventro-médial
Zac1	= PLAGL1 Pleiomorphic Adenoma Gene-Like 1

INTRODUCTION

I- La programmation nutritionnelle

1- Obésité, diabète, maladies cardiovasculaires : Le syndrome métabolique un enjeu mondial

L'obésité, le diabète et les maladies cardio-vasculaires associées sont devenus de manière évidente des enjeux de santé publique. En effet, en 2012 en France, 15% de la population adulte soit 7 millions de personnes sont obèses (Etude ObEpi), et 2,9 millions sont atteintes de diabète, essentiellement de type 2. Toutes ces pathologies participent au développement du syndrome métabolique. Il s'agit d'une entité clinique et biologique caractérisée par l'association chez un même individu de plusieurs facteurs de risque allant de la résistance à l'insuline, à la dyslipidémie en passant par l'hypertension et l'intolérance au glucose. Le risque d'apparition d'un syndrome métabolique est potentiellement influençable par des facteurs environnementaux comme l'hygiène alimentaire, l'activité physique mais également par des facteurs dits de susceptibilité génétique qui le favorisent (Mayer 1996).

Avant les années 1990, l'absence de définition claire et universelle du syndrome métabolique rendait la comparaison des différentes études extrêmement difficile. Dans les années 1990, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et le NIH (National Institute of Health) proposent une 1^{ère} définition historiquement basée sur l'insulino-résistance et/ou l'hyperinsulinémie. Cette définition a largement évolué au cours du temps (Alberti 2009, Alberti 2005) (Tableau 1 et 2)

Tableau 1 : Evolution des définitions du Syndrome Métabolique : NCEP (National Cholesterol Education) /ATP III (Adult Treatment Panel III), IDF (International Diabetes Federation) 2005 et IDF 2009

	NCEP/ATPIII (2001)	IDF (2005)	IDF/AHA/ NHLBI (2009)
	3 des 5 critères suivants	tour de taille + 2 des 4 autres critères	3 des 5 critères suivants
Tour de taille élevé	≥ 102 cm/hommes ≥ 88 cm/femmes	indispensable, avec seuils ethno-centrés ; origine européenne ≥ 94 cm/hommes ≥ 80 cm/femmes	seuils ethno-centrés, reprenant les seuils IDF 2005 pour les non-européens et laissant le choix entre seuils IDF et seuils NCEP/ATP III pour ceux d'origine européenne
TG élevés	$> 1,5$ g/L ou traitement	$> 1,5$ g/L ou traitement	$> 1,5$ g/L ou traitement
HDLc bas	$< 0,40$ g/L : hommes $< 0,50$ g/L : femmes	$< 0,40$ g/L : hommes $< 0,50$ g/L : femmes	$< 0,40$ g/L : hommes $< 0,50$ g/L : femmes
PA élevées	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 90 mm Hg ou traitement	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement
Glycémie à jeun élevée	$\geq 1,1$ g/L ou traitement	$\geq 1,0$ g/L ou traitement	$\geq 1,0$ g/L ou traitement

Tableau 2 : Définition du Syndrome Métabolique par l'OMS 1998

OMS (1998)	Diabète, troubles de la glycémie à jeun, tolérance abaissée au glucose ou insulino-résistance (HOMA) + 2 des autres critères
Rapport taille/hanche	$> 0,90$ /hommes, $> 0,85$ femmes
TG élevés ou HDLc bas	TG $> 1,5$ g/L ou HDL $< 0,35$ g/L : hommes; $< 0,39$ g/L : femmes
Excrétion albumine urinaire	> 20 μ g/min
PA	$> 140/90$ mm Hg ou traitement

En France, la prévalence du syndrome métabolique est élevée, de l'ordre de 25% chez les hommes et 19% chez les femmes (Projet MONICA : enquête de population entre 1995-1998. Etude multicentrique Lille, Strasbourg, Toulouse sur 1700 hommes et 1700 femmes de 35 à 64 ans). Cette prévalence est comparable aux valeurs pouvant être observées en Europe du Nord et aux Etats Unis. Mais il existe tout de même une grande diversité géographique avec des valeurs deux fois plus importantes dans le nord de la France par rapport au sud.

La survenue du syndrome métabolique est associée à de nombreux facteurs. La prévalence du SM augmente significativement avec l'âge (étude MONICA) et est plus faible chez les sportifs que chez les personnes sédentaires (Dallongeville 2004). Le contexte socioéconomique entre également en jeu. En effet, un niveau d'éducation et un niveau de vie plus élevés sont associés à une fréquence plus faible de SM (McLaren 2007, Pigeyre 2011). Cette relation pourrait éventuellement s'expliquer par l'influence des facteurs économiques sur le choix de produits alimentaires de très bonne qualité, sur l'accès à la pratique de l'activité sportive... Le rôle de ces facteurs socioéconomiques est extrêmement important notamment dans la mise en place d'une stratégie de communication pour la prévention.

Malheureusement et compte tenu de l'augmentation croissante de l'obésité en France, la communauté scientifique et médicale pense raisonnablement que le taux de survenue du syndrome métabolique augmentera de façon significative dans les années à venir. En effet, en France l'enquête ObEpi-Roche 2012 montre qu'entre 2009 et 2012, l'augmentation de la prévalence de l'obésité se poursuivait même si cette augmentation était moins forte. En 2012, 32% de la population française étaient en surpoids et 15% obèses et ceci quel que soit le sexe (Figure 1).

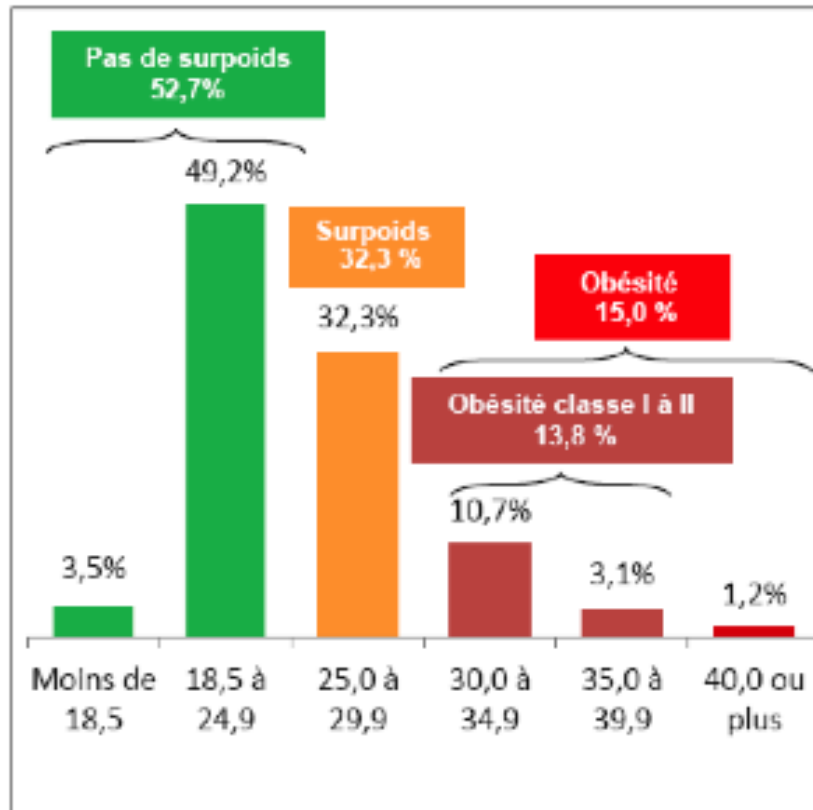


Figure 1: Répartition de la population française en fonction du niveau d'IMC en 2012.
D'après ObEpi-Roche 2012

L'obésité est un facteur de risque majeur de développement du syndrome métabolique et constitue donc un problème de santé publique dans les pays industrialisés mais également dans les pays en cours de développement. Selon l'OMS, 1,6 milliard d'adultes seraient en surpoids dans les pays en cours de développement, et ce chiffre devrait atteindre 3,3 milliards en 2030. 80% des personnes touchées par l'obésité appartiendront alors aux pays dits émergents. En Chine, le nombre de personnes en surcharge pondérale est passé de moins de 10% à 15% en 3 ans. Le Brésil et la Colombie comptent environ 40% de personnes obèses. Même l'Afrique subsaharienne, où vivent la majorité des populations sous-alimentées du monde, connaît un accroissement de l'obésité, en particulier chez les femmes des zones urbaines (Figure 2).

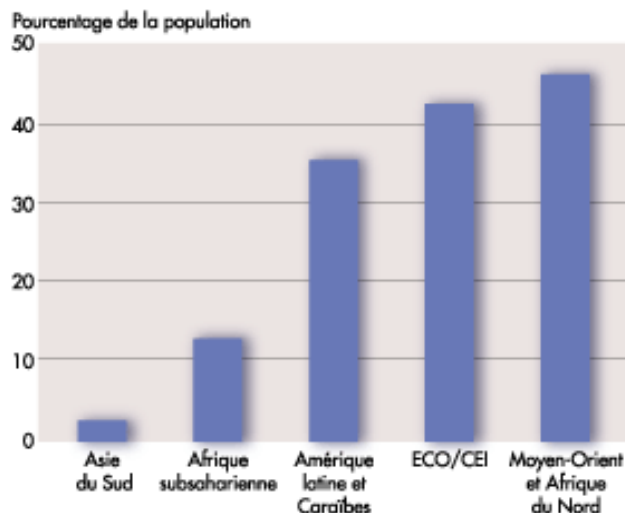


Figure 2: Pourcentage de la population féminine obèse dans les pays en cours de développement. ECO/CEI : Europe centrale et orientale et communauté des Etats indépendants

L'obésité correspond à une accumulation de tissu adipeux essentiellement au niveau de l'abdomen et des viscères. Ce stockage excessif de graisse est dû à un déséquilibre de la balance énergétique au bénéfice du stockage d'énergie par rapport aux dépenses. Il est également fortement lié à l'hygiène de vie et l'alimentation.

Plusieurs études ont montré l'importance du changement de style de vie dans les pays en cours de développement, caractérisé par l'apparition d'une alimentation plus riche en graisses et en sucres associée à une vie plus sédentaire (Prentice 2006).

Le développement de l'obésité semble être couplé à l'émergence d'un défaut progressif des réponses du système nerveux central liées à la récompense allant jusqu'à générer dans le cerveau des mécanismes semblables à celui de l'addiction conduisant donc à des prises alimentaires compulsives (Cottone 2009). En effet, l'obésité jouerait un rôle dans le dérèglement du comportement alimentaire médié par le système nerveux central conduisant à une hyperphagie et à des comportements alimentaires compulsifs (Johnson 2010).

Il est important de noter que les pays en cours de développement sont les pays où les maladies métaboliques se développent le plus vite (Popkin 2002) comme par exemple le diabète de type 2 dont les prévisions seraient d'environ 300 millions de personnes atteintes en 2025 (Kiberstis 2005). Les changements rapides de mode de vie et d'alimentation accroissent de

manière exponentielle les risques de survenue d'obésité, pouvant être un accélérateur de survenue des maladies liées au syndrome métabolique.

2- (Dé)Nutrition périnatale et programmation

Depuis de nombreuses années, il a été montré et prouvé que l'environnement, et notamment la nutrition, contribuait de manière prépondérante au dérèglement du métabolisme énergétique associé notamment à l'obésité. Le 20^{ème} siècle a été le siècle de l'augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires dans les pays industrialisés, devenant l'une des principales causes d'hospitalisation et de mortalité. Il a été largement montré qu'il existait une relation forte entre des événements survenus tôt dans la vie et le développement de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte. Cela suggère que les conditions de vie particulièrement difficiles dans l'enfance et l'adolescence et en particulier une nutrition non optimale pourraient être un facteur de risque de survenue de pathologies coronariennes plus tard dans la vie.

a- Evidence épidémiologique entre poids de naissance et pathologies à l'âge adulte

a-1- Faible poids de naissance

Les faibles poids de naissance sont classés en trois catégories : extrêmes < 1 kg, très faibles < 1,5 kg et petits < 2,5 kg.

D'après un rapport de l'UNICEF (United Nations International Children's Emergency Fund), plus de 20 millions de bébés viennent au monde avec un poids de naissance inférieur à 2.5 kg, les pays en cours de développement étant les plus touchés (Figure 3).

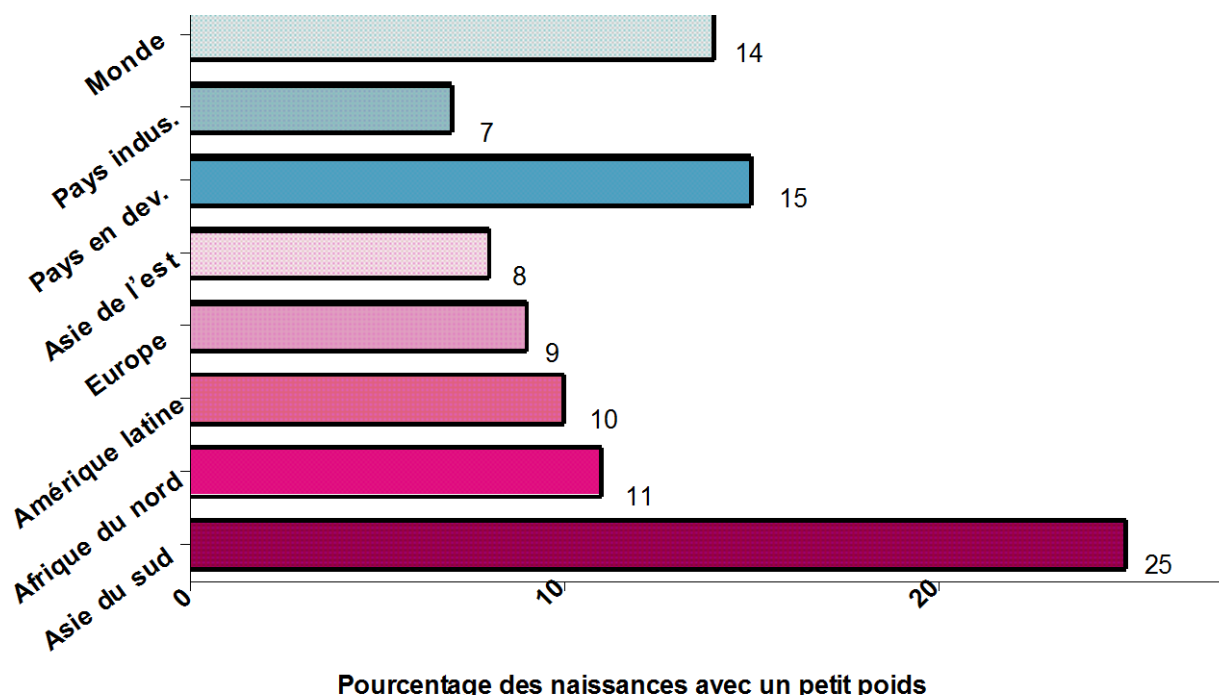


Figure 3: Pourcentage de naissances avec un faible poids. Adapté de l'UNICEF 2004

Mais au delà de la notion de poids de naissance, il semble important de prendre également en compte l'âge gestationnel de ces enfants. En effet, le terme de « nouveau-né avec un petit poids de naissance » englobe à la fois les nouveaux-nés prématurés nés avant la 37^{ème} semaine d'aménorrhée, et ceux nés à terme après la 37^{ème} semaine d'aménorrhée mais ayant soufferts d'une croissance réduite in utero.

Le nombre de naissances prématurées est en constante augmentation en France avec notamment une forte augmentation de la grande prématurité. Elles représentent un enjeu de santé publique tant leur prise en charge est lourde et la venue au monde d'un enfant prématuré dans une famille entraîne un bouleversement considérable sur le plan familial et social. Il peut y avoir plusieurs causes à la prématurité : le retard de croissance intra-utérin, la diminution des échanges foeto-maternels via le placenta avec une diminution des apports énergétiques au fœtus, les grossesses multiples, les pathologies maternelles comme la prééclampsie... La prématurité a des conséquences très importantes sur la mortalité néonatale et les handicaps de l'enfant.

a-2- Faible poids de naissance et maladies cardiovasculaires

L'étude réalisée par Barker (Barker 1989) en Grande Bretagne (5654 hommes nés entre 1911-30 avec mesure du poids de naissance et du poids à un an) a mis en évidence un lien entre la survenue des maladies coronariennes à l'âge adulte et l'environnement fœtal et néonatal. Le taux de mortalité lié à des pathologies ischémiques cardiaques est le plus élevé chez les hommes nés avec un faible poids de naissance et ayant encore un poids faible à l'âge d'un an. David Barker a alors montré que les pathologies à l'âge adulte pouvaient avoir un lien avec les conditions de vie périnatale, montrant en effet une corrélation inverse entre le poids de naissance et l'incidence de mortalité pour les pathologies cardiaques à l'âge adulte (Barker 1989).

Par la suite, de nombreuses études épidémiologiques ont confirmé ces résultats sur un ensemble de populations variées (Europe, Amérique du Nord, Inde, Chine...) (Eriksson 2001, Yajnik 2002, Chen 2008). Cette corrélation a été étendue à la courbe de poids pré et postnatale et l'augmentation de survenue de pathologies plus diverses comme l'hypertension, le diabète de type 2 ou l'obésité, caractérisant le syndrome métabolique plus généralement.

La cohorte d'Helsinki (8 760 hommes et femmes nés entre 1934 et 1944 avec des mesures de taille et de poids à la naissance et à l'âge de 2 ans) a montré une corrélation entre un faible poids de naissance et le risque de survenue d'accidents vasculaires cérébraux à l'âge adulte (Hypponen 2001), ceci *via* une association entre un petit poids de naissance suivi d'un rattrapage de croissance rapide dans les deux premières années de vie et une augmentation de l'épaisseur de l'intima média des vaisseaux (Oren 2004).

Les données de la cohorte des infirmières américaines (Nurses' Health Study) confirment la relation inverse entre le poids de naissance et les accidents coronariens, et précisent l'interaction entre un petit poids de naissance et un IMC (Indice de Masse Corporelle) élevé à l'âge adulte (Rich-Edwards 2005). Ainsi, cette relation inverse entre le poids de naissance et le risque coronarien est plus important chez les femmes ayant un IMC plus élevé à l'âge adulte.

Toutes ces études montrent un lien étroit entre un faible poids de naissance et la survenue de pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte. Des stimuli environnementaux, comme la nutrition, pourraient avoir une influence précoce au cours de la vie, programmant ainsi la survenue de pathologies cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte.

a-3- Poids de naissance / rattrapage de croissance et pression artérielle

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existait une relation inverse entre le poids de naissance et la pression artérielle à l'âge adulte chez l'homme et la femme.

En France, une cohorte de 1600 personnes nées entre 1971 et 1985 a montré une relation entre des tensions systoliques élevées et un petit poids de naissance (Jaquet 2005).

Une étude menée en Angleterre portant sur 346 hommes et femmes âgés de 22 ans a confirmé les résultats obtenus en France en précisant que la pression artérielle augmentait avec le gain de poids durant l'enfance (Law 2002).

Il semblerait qu'un rattrapage de croissance postnatale jouerait un rôle clé dans la pression sanguine à l'âge adulte. Il existerait en effet une relation positive entre l'élévation de la pression artérielle à l'âge adulte et le rattrapage de croissance soit de manière immédiate après la naissance soit durant les 1^{ères} années de vie (Ben Shlomo 2008, Forsen 1998).

b- L'hypothèse du « thrifty phenotype »

Le « thrifty phenotype » est une hypothèse qui propose d'expliquer le lien entre une mauvaise croissance fœtale et post-natale et le développement d'un diabète de type 2 et d'un syndrome métabolique à l'âge adulte dû aux effets néfastes d'une nutrition précoce inadaptée produisant des changements permanents du métabolisme.

Cette hypothèse proposée par Hales et Barker (Hales 1991) permet d'expliquer le lien entre une faible croissance fœtale, infantile et le risque de survenue de pathologies chroniques, comme l'intolérance au glucose (Hales 1991) ou un syndrome métabolique à l'âge adulte. La dénutrition au cours des différentes périodes du développement fœtal ou infantile est le pivot de cette hypothèse (Figure 4).

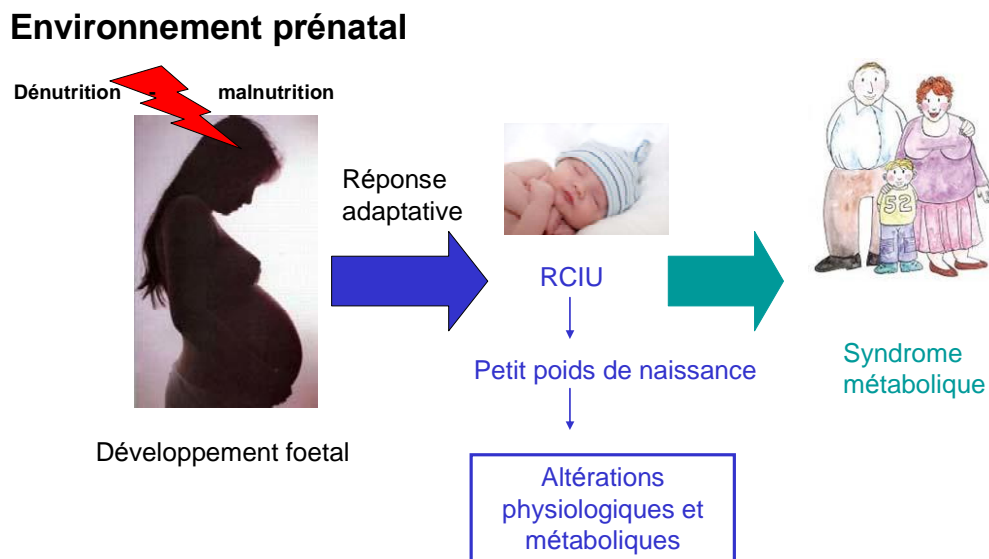


Figure 4: **Illustration de la théorie de programmation foetale de Barker**

Les 1^{ères} données montrant cette étroite relation sont basées sur des études épidémiologiques sur les enfants conçus ou nés au cours de la famine hollandaise en 1944-45. L'exposition périnatale à la famine a entraîné une augmentation de la prévalence d'obésité à l'âge adulte. D'autres études ont montré que dans un environnement foetal dénutri, on observe une résistance à l'insuline dès la période foetale, réponse adaptative permettant d'optimiser la croissance des organes clés comme le cerveau et le cœur au détriment d'autres organes comme le muscle et le foie. Cette adaptation a pour but la survie à court terme du fœtus.

L'individu développerait donc ce que David Barker a nommé le « thrifty phenotype » ou « phénotype économe » qui lui permettrait de survivre dans un environnement nutritionnel pauvre. Mais cette adaptation peut se révéler inappropriée et même délétère si l'environnement nutritionnel postnatal apporte au contraire des quantités suffisantes voire excessives de nutriments (Figure 5).



Figure 5: Origines développementales des pathologies à l'âge adulte. D'après McMillen et Robinson 2005

Les études épidémiologiques chez l'Homme ne sont malheureusement pas suffisantes pour mettre en relief tous les mécanismes impliqués. Afin de mieux les appréhender, il a été nécessaire de développer des modèles animaux de sous et sur-nutrition pendant la gestation (Langley Evans 2008) afin de mieux évaluer le lien entre la nutrition et la programmation de diverses pathologies.

c- Les modèles d'étude

Les modèles animaux ont permis de confirmer le lien identifié chez l'Homme entre la nutrition précoce et les pathologies observées à plus ou moins long terme. Mais ils ont également permis de comprendre certains mécanismes physiologiques et moléculaires engagés dans cette programmation nutritionnelle. Ces derniers restent en effet très difficilement appréhendables chez l'Homme car ils nécessitent notamment l'étude de cohorte sur le long terme, l'accès à des prélèvements invasifs et des études transgénérationnelles.

Les études sur la programmation nutritionnelle chez les animaux ont commencé au début des années 90 avec un nombre très important de modèles développés. La majorité des modèles animaux utilisent des espèces de petites tailles comme le rat et la souris afin d'exploiter au mieux leurs différentes caractéristiques.

En effet, les rongeurs sont des animaux avec un temps de gestation et de vie court et leur génome est extrêmement bien caractérisé. Mais le mouton est également utilisé car la croissance fœtale et post-natale des nouveau-nés est comparable à celle de l'Homme. Grâce à ces modèles, il a été possible d'étudier l'impact des variations du régime alimentaire des mères, à différents stades de la gestation, sur le développement du fœtus et des nouveau-nés et sur les conséquences à long terme sur de nombreux paramètres physiologiques mais aussi comportementaux.

Les manipulations sur le régime alimentaire de ces modèles sont diverses allant de la restriction globale ou protéique à l'excès calorique ou lipidique.

Plusieurs approches ont été développées avec différents niveaux de restriction et durant différentes périodes de la gestation.

c-1 La restriction calorique maternelle

La restriction calorique par réduction des apports caloriques habituellement ingérés au cours de différentes fenêtres d'exposition durant la gestation est une des approches pour étudier la programmation nutritionnelle chez les rats notamment. Ces études utilisant une restriction calorique entre 50% et 70% par rapport à la quantité de nourriture consommée par les mères nourries *ad libitum* ont montré que la restriction calorique entraînait des troubles à la fois endocriniens et métaboliques chez les nouveau-nés. Ces effets sont modulés en fonction de la période de la gestation au cours de laquelle a lieu la restriction calorique (Tableau 3).

Tableau 3 : Conséquences phénotypiques de la restriction calorique maternelle chez la descendance

Stimulus	Période du développement	Sexe / âge de l'étude	Phénotype	Référence
50% de restriction	3 ^{ème} semaine de gestation	Mâles et femelles / 21 jours	↓ du nombre de cellules β	Garofano 1997
50% de restriction	3 ^{ème} semaine de gestation + toute la lactation	Mâles / 3 mois	↓ de la masse de cellules β	Garofano 1998
50% de restriction	3 ^{ème} semaine de gestation + toute la lactation	Mâles / 12 mois	Intolérance au glucose	Garofano 1999
70% de restriction	Gestation	Mâles / 3-4 mois	Hyperphagie, obésité, hypertension	Vickers 2000

La restriction calorique globale maternelle entraîne également une diminution de la croissance fœtale et une augmentation de la pression sanguine chez l'adulte par rapport au groupe contrôle (Woodall 1996). Ce même modèle a également montré que lorsque ces animaux de petit poids de naissance étaient nourris à l'âge adulte avec un régime hypercalorique ou obésogène, ils présentaient une prédisposition au gain de poids (Vickers 2003). Mais ce modèle a été très critiqué car éloigné de la nutrition humaine contemporaine.

c-2- La restriction protéique maternelle

Un modèle plus couramment utilisé, basé sur la restriction protéique maternelle pendant la gestation et/ou la lactation chez le rat ou la souris a été développé et est actuellement l'un des

mieux caractérisé (Langley Evans 1994, 1996, Ozanne 2004, Coupé 2009, Faça-Berthon 2009).

Du fait de l'importance des protéines dans la croissance et le développement de l'organisme, de nombreuses études utilisant un modèle de restriction protéique maternelle ont été réalisées afin de mieux caractériser les conséquences de cette restriction pendant la vie fœtale et/ou post-natale.

Ce modèle de restriction protéique consiste à nourrir *ad libitum* des femelles gestantes avec un régime alimentaire restreint seulement en protéines (5-8% au lieu de 20%). Ce régime est néanmoins isocalorique en comparaison d'un régime contrôle (Snoeck 1990, Langley 1994). Il est également représentatif de la situation de l'Homme où les quantités de protéines disponibles sont extrêmement variables selon les régions du monde. Il permet également de mimer la diminution des échanges fœto-maternels généralement due à une insuffisance placentaire en mimant la réduction des apports en acides aminés responsable d'un retard de croissance intra-utérin pouvant conduire à une naissance prématurée comme nous l'avons vu précédemment.

Ce modèle de restriction protéique a un effet plus ou moins marqué sur la croissance fœtale (Langley Evans 1996) entraînant des retards de croissance intra-utérin plus ou moins sévères (Desai 1996, Fernandez-Twinn 2005). Il entraîne également une augmentation de manière très importante de la pression sanguine qui persiste à l'âge adulte (Langley 1994) et provoque des défauts de développement du système rénal. Il a également été montré que les rats nés de mères soumises à une restriction protéique avaient une espérance de vie plus courte (Aihie-Sayer 2001), des troubles de l'homéostasie glucidique avec une intolérance au glucose (Fernandez-Twinn 2005), des dysfonctions vasculaires (Torrens 2006) et des troubles du comportement alimentaire (Bellinger 2004). La restriction protéique maternelle conduit également à une augmentation des taux circulants d'homocystéine (Rolland 1995) largement connue pour ses effets néfastes. La toxicité de l'homocystéine en cas de taux très élevé a en effet été décrite dans certains cas de maladies vasculaires comme les coronaropathies, les infarctus, les thromboses veineuses et les atteintes cérébrovasculaires. Une hyperhomocystéinémie entraîne également des anomalies du squelette, des retards du développement voire même un retard mental.

Ce modèle a mis en évidence la survenue d'une résistance à l'insuline à l'âge adulte (Ozanne 2003) avec un « timing » différent selon le sexe et une augmentation du risque de survenue d'obésité (Tableau 4).

Tableau 4 : Conséquences phénotypiques de la restriction protéique maternelle chez la descendance

Stimulus	Période du développement	Sexe / âge de l'étude	Phénotype	Référence
9% de protéine	Gestation	Mâles et femelles / 1 mois	↑ tension artérielle	Langley-Evans 1994
8% de protéine	Gestation et lactation	Femelles / 21 mois	Hyperinsulinémie	Fernandez-Twinn 2005
8% de protéine	Gestation	Mâles et femelles / naissance	↓ de la prolifération des cellules b et de la taille des îlots pancréatiques	Snoeck 1990
9% de protéine	Gestation	Mâles et femelles / 9-18 mois	↑ graisse abdominale	Bellinger 2006
8% de protéine	Gestation et lactation	Mâles et femelles / 11 mois	↓ de la masse musculaire	Desai 1996
8% de protéine	Gestation et lactation	Mâles / 15 mois	Insulino-résistance	Ozanne 2003

c-3- Le régime hyper-protéique maternel

A l'opposé de la restriction protéique, plusieurs études ont voulu montrer les conséquences d'une alimentation riche en protéines pendant la grossesse sur les nouveau-nés. L'évidence aurait voulu que les effets soient à l'opposé de ceux observés avec la restriction protéique. Mais il a été montré, chez le rat, qu'une alimentation maternelle contenant une forte teneur en protéines (40% vs 20%) au cours de la gestation et de la lactation conduisait à une nette augmentation du poids et de l'adiposité ainsi qu'à une augmentation de la tension artérielle (Thone-Reineke 2006).

De plus, il a été montré qu'une augmentation des apports protéiques à la suite d'un RCIU (Retard de croissance intra-utérin) induisait des effets à long terme comme l'augmentation des taux plasmatiques d'insuline, de triglycérides (Delamaire 2012)

Pour l'Homme, la consommation d'un régime hyper-protéiné au cours des premiers mois de vie via des formules de lait infantile enrichies en protéines augmentait de manière significative le pourcentage de masse grasse (Gunther 2007).

c-4- La ligature des artères utérines

Un modèle, principalement développé chez le rongeur, de ligature des artères utérines a été développé et entraîne une restriction de la croissance intra-utérine. En effet, cette ligature réduit le flux sanguin vers le placenta et donc réduit les apports au fœtus. Ce modèle est considéré comme similaire à l'insuffisance placentaire humaine. La ligature des artères utérines est souvent utilisée pour étudier des troubles métaboliques tels que le diabète (Stoffers 2003) mais également pour explorer les effets sur les néphropathies (Wlodak 2008).

Des modèles plus subtils ont été mis en place par la suite, portant toujours sur la restriction mais sur des catégories de nutriments bien précis comme la carence en micronutriments (fer, zinc, calcium, vitamines...). Ils affectent de manière significative la pression artérielle et le système cardiovasculaire (Grambling 2005, Andersen 2006, Bergel 2002).

Mais plus que la restriction, les modèles qui se développent actuellement sont des modèles basés sur la suralimentation et la supplémentation afin de mieux appréhender les problèmes survenant dans notre société contemporaine et sa consommation de nourriture en excès en terme de quantité et de qualité nutritionnelle ainsi que l'afflux de compléments nutritionnels pour éviter toute carence éventuelle (Samuelsson 2008, Akyol 2009, Nivoit 2009).

c-5- Le régime hyper-lipidique maternel (high-fat)

Des modèles plus récents utilisent le régime cafétéria extrêmement riche en sucres simples et en gras, ce qui est très représentatif des régimes obésogènes contemporains de l'Homme (Nivoit 2009, Samuelsson 2008). En effet, ces régimes correspondent à un déséquilibre alimentaire de plus en plus fréquent dans les populations occidentales où l'apport excessif de

graisse et de sucre augmente le risque de survenue d'obésité mais augmente également la pression artérielle, la masse grasse et la résistance à l'insuline.

Des effets équivalents chez des rats nés de mères soumises à un régime cafétéria pendant la gestation et/ou la lactation ont pu être observés. Ces rats présentent des affections propres au syndrome métabolique comme l'hypertension, l'hyperlipidémie ou encore l'intolérance au glucose (Khan 2003).

c-6- La suralimentation par réduction de portée

Il s'agit d'un modèle couramment utilisé pour évaluer l'influence de la nutrition pendant la période néonatale. Il consiste en la réduction de la taille de la portée au cours de la lactation de manière à augmenter la quantité de lait mise à disposition pour les nouveau-nés. Les rats sont par conséquent en situation de suralimentation et ils présentent une hyperinsulinémie et une hyperleptinémie (Plagemann 2006). Ils présentent également une hyperphagie associée à une prise de poids excessive à long terme et à des altérations impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et métabolisme énergétique (Davidowa 2007)

Toutes les études qui portent sur la programmation nutritionnelle et qui sont faites sur ces différents modèles animaux ont démontré que l'hypothèse d'un lien entre nutrition et pathologies à la naissance mais aussi à l'âge adulte était établie. Les effets d'une période même brève de sur ou sous-nutrition durant la gestation ont été démontrés malgré la grande diversité des modèles à disposition.

Il semble donc intéressant de mettre en évidence les cibles physiologiques sensibles à ces modifications nutritionnelles périnatales.

II- Physiopathologie du syndrome métabolique

1- Les mécanismes physiologiques du syndrome métabolique et de la programmation nutritionnelle

a- Programmation nutritionnelle d'organes clés impliqués dans le SM

L'utilisation des modèles animaux décrits précédemment a permis de mettre en lumière différents paramètres sensibles à la nutrition comme la structure de certains organes, leur taille et leur nombre de cellules (Waterland 1999, Fowden 2004). En effet, des altérations dans la structure d'un organe au cours de l'organogenèse vont induire des modifications de son organisation entraînant des modifications de la réponse cellulaire aux hormones et aux nutriments au cours de la vie (Figure 6).

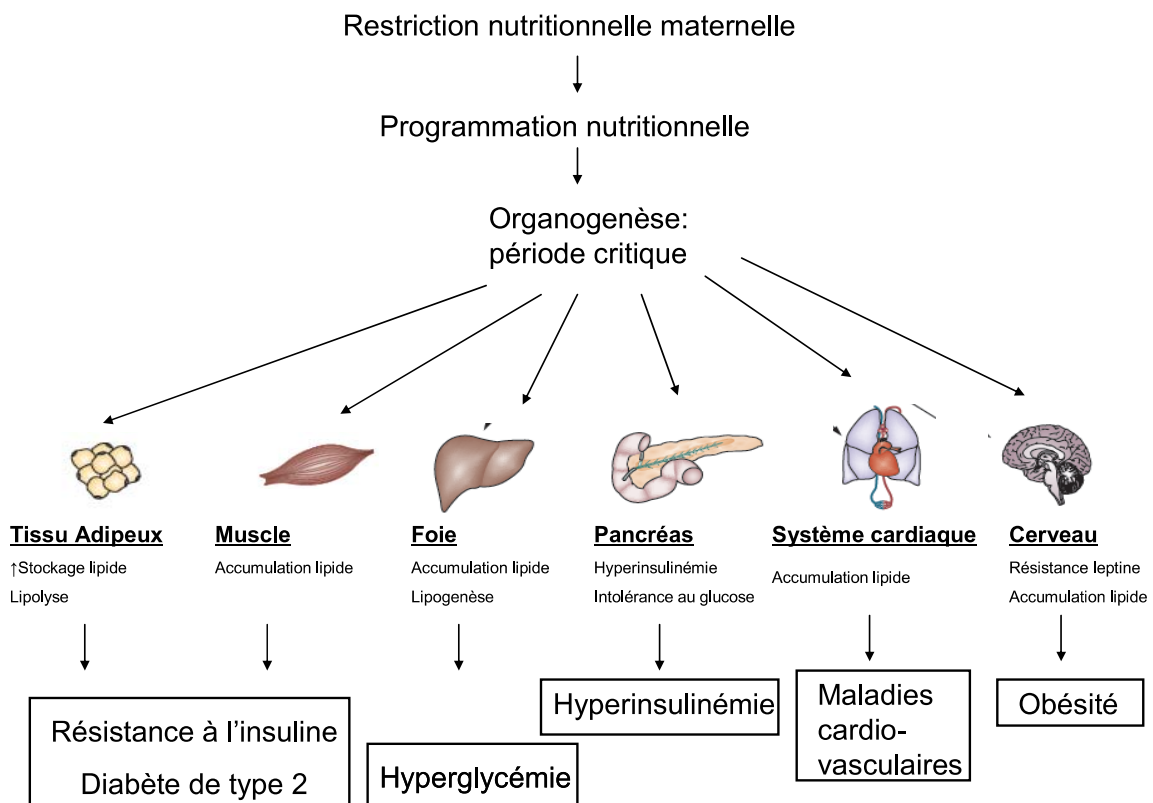


Figure 6: Le rôle de l'environnement nutritionnel maternel dans la programmation nutritionnelle des différents organes.

a-1- Le pancréas

La restriction protéique maternelle affecte le pancréas en engendrant une hypoplasie et une hypotrophie cellulaire (Portha 2011). Comme l'activité métabolique du pancréas est dépendante du nombre de ses cellules, son métabolisme s'en trouve affecté. En effet, des apports protéiques et caloriques non adaptés (Garofano 1997) pendant la gestation ont pour conséquence une diminution du nombre des cellules β ainsi qu'une réduction de 50% de la vascularisation des îlots pancréatiques également associée à une réduction de l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Snoeck 1990). Ce défaut de vascularisation serait un des mécanismes impliqués dans l'altération de la masse des cellules β (Ham 2009). Lors d'une restriction protéique dans l'alimentation maternelle (8% vs 20%), les nouveau-nés RCIU présentaient une réduction de la prolifération des îlots pancréatiques associée à une réduction d'environ 25% de leur taille (Snoeck 1990).

La restriction protéique provoque également une diminution de la prolifération spécifique des cellules β avec une augmentation concomitante de la longueur du cycle cellulaire et du nombre de cellules en apoptose (Petrik 1999).

De plus, si la dénutrition maternelle se poursuit au cours de la lactation, la réduction de la masse des cellules β s'élève à 70% au sevrage chez les mâles. Ce phénotype perdure à l'âge adulte même après avoir retrouvé une alimentation normale au sevrage (Garofano 1998).

a-2- Le rein

La nutrition précoce, notamment pendant l'organogenèse, a un impact sur d'autres tissus impliqués dans le syndrome métabolique. Il a notamment été proposé que la sous-nutrition maternelle responsable d'un petit poids de naissance pouvait conduire à des altérations permanentes de la structure des reins contribuant au développement de pathologies cardio-rénales (Nijland 2008, Nuyt 2009) (Figure 7). En effet, il y a environ 25 ans, Brenner et son équipe proposèrent une théorie portant sur le lien entre un petit poids de naissance et la réduction du nombre total de néphrons conduisant notamment à une rétention du sodium et une hyperfiltration des néphrons, tout ceci jouant un rôle sur la survenue d'une hypertension, d'une protéinurie et sur l'installation progressive d'une insuffisance rénale (Brenner 1994, 1988).

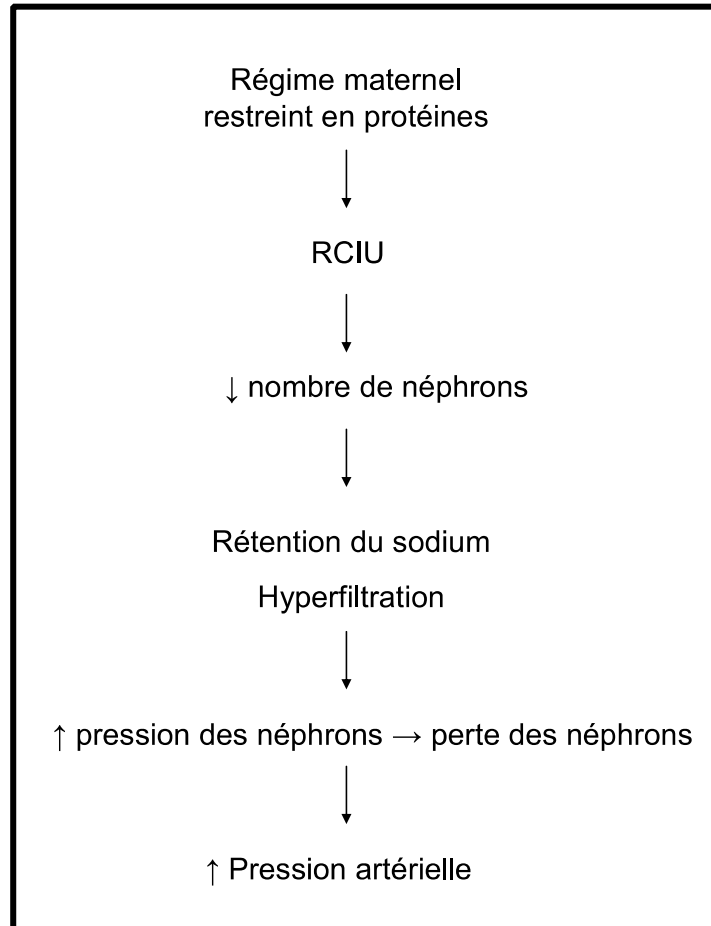


Figure 7: Schéma résumant le lien entre un régime maternel pauvre en protéines, une diminution du nombre de néphrons et la survenue d'une hypertension. D'après Brenner 1994, 1988

Physiologiquement, la néphrogenèse est complète au cours de la 32^{ème} ou 34^{ème} semaine et le nombre total de néphrons chez un adulte en bonne santé varie énormément (Puelles 2011). Il a été montré que le nombre de néphrons chez l'adulte et l'enfant est corrélé de manière linéaire au poids de naissance et qu'il augmente de 257 426 par kilogramme de poids de naissance (Hughson 2003).

Chez le rat, la néphrogenèse commence environ au 12^{ème} jour de gestation et ne sera complète qu'au 8^{ème} jour après la naissance (Larsson 1980).

Des études menées chez l'animal ont démontré cette association entre un petit poids de naissance et une réduction du nombre de néphrons, ou des dysfonctions rénales. Un petit poids de naissance, induit par un régime maternel restreint en protéines durant la gestation, cause une diminution d'environ 30% du nombre de néphrons et une pression sanguine élevée à 10 semaines chez le rat (Mesquita 2010, 2010). A 16 semaines, il a également été montré

une diminution de 50% de l'excrétion rénale de sodium et une diminution du nombre de récepteurs à l'angiotensine II jouant sur la pression artérielle.

Un modèle d'insuffisance utéro-placentaire induit par la ligature bilatérale des artères utérines chez une rate gestante de 19 jours induit également de manière significative une réduction du nombre de glomérules et une augmentation de la fonction de filtration glomérulaire (Pham 2003).

a-3- Le foie

Il existe de nombreux éléments de preuve d'atteinte du foie comme cible de la programmation nutritionnelle. Cette dernière altère notamment l'expression de gènes codants pour des enzymes impliquées dans la production énergétique hépatique (Lane 1996), dans la diminution de la phosphorylation oxydative (Ogata 1990) et dans le transport du glucose hépatique (Lane 1999). L'atteinte de ce dernier est une composante importante de la résistance périphérique à l'insuline associée au diabète de type 2.

Il a été montré que la restriction protéique maternelle induisait des changements de structure et de fonction du foie. En effet, la restriction protéique (RP) engendre une augmentation de la taille des lobules hépatiques (Burns 1997) tout en diminuant leur nombre (Souza Mello 2007) et augmente le taux d'apoptose hépatocytaire.

Elle altère également certaines activités enzymatiques hépatiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie du glucose (Desai 1995, 1997), la sensibilité hépatique à l'insuline (Ozanne 1996) et la tolérance au glucose (Hales 1996) qui font partie du syndrome métabolique.

Des profils d'expression de gènes dans le foie ont été réalisés chez des rats adultes exposés à une sous-nutrition maternelle. Ils ont montré 249 gènes exprimés de manière différentielle appartenant à des classes de gènes impliqués dans le développement du tissu adipeux et de la résistance à l'insuline (Morris 2009). Ces animaux ont également présenté une diminution d'expression de gènes clés impliqués dans l'entrée cellulaire du glucose et de son métabolisme.

a-4- Le muscle

Les fibres musculaires ou myofibrilles sont les unités structurales du muscle squelettique. La myogenèse prénatale peut être divisée en 2 étapes, la myogenèse primaire et secondaire. Les deux types de fibres dérivent de cellules souches mésenchymateuses (Bailey 2001)

La myogenèse primaire se déroule principalement au cours de la période embryonnaire vers le 14^{ème} jour de gestation chez le rat (Wigmore 1998) et entre la 6^{ème} et 8^{ème} semaine de gestation chez l'Homme.

La myogenèse secondaire se déroule en période fœtale entre le 17^{ème} et le 21^{ème} jour chez le rat et la 8^{ème} et 18^{ème} semaine chez l'Homme (Wigmore 1998, Barbet 1991).

L'étape finale est l'établissement du muscle adulte notamment par hypertrophie (Brameld 2000) pendant la période post-natale où les facteurs de croissance influencent de manière importante les caractéristiques du muscle chez l'adulte (Maltin 2001).

La nutrition maternelle affecte profondément le développement fœtal du muscle (Zhu 2004). Pendant la période embryonnaire, elle a des effets mineurs sur le développement du muscle squelettique à cause du petit nombre de fibres musculaires.

Les effets pendant la période fœtale sont tout autres. Il a été montré que des apports nutritionnels non appropriés, comme une restriction en protéines, pendant la période fœtale précoce ou en milieu de gestation ont un impact sur la densité des fibres musculaires en la réduisant. En effet des mesures aux ultrasons sur des foetus RCIU humains montrent une réduction de la masse musculaire (Padoan 2004, Larciprete 2005) avec une atteinte du nombre de fibres musculaires et de leurs tailles.

D'autres études épidémiologiques ont démontré une association positive entre le poids de naissance et la masse musculaire à différents moments de la vie comme lors de l'enfance (Hediger 1998), l'adolescence (Singhal 2003), ou encore chez les jeunes adultes (Kahn 2000) ou les personnes âgées (Sayer 2004).

Des travaux sur des modèles animaux ont montré qu'une sous-nutrition prénatale est associée à une réduction du poids du muscle néonatal chez le mouton (Greenwood 2000), et à une réduction du nombre de fibres musculaires postnatales chez le cochon (Dwyer 1994) et le rat (Wilson 1988). Et ces effets persistent avec le temps (Prakash 1993, Pond 1990).

Le nombre de fibres musculaires est un déterminant important de la masse et de la force musculaire, et un grand nombre d'études ont décrit des facteurs influençant le nombre, la taille et le type de fibres (Dauncey 1996). Des facteurs génétiques semblent en effet être les principaux modulateurs du nombre de fibres primaires alors que des facteurs environnementaux comme la sous-nutrition maternelle ont un effet prédominant sur la croissance et le développement des fibres secondaires (Maltin 2001). L'étude la plus récente sur le sujet menée dans notre laboratoire a montré que la restriction protéique maternelle influençait exclusivement la densité des fibres secondaires sans atteinte des fibres primaires (da Silva Aragao 2013)

a-5- Le système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) et plus particulièrement l'hypothalamus est le centre de la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Il est composé de différentes structures comme le noyau ventro-médial (VMH), le noyau arqué (ARC) et le noyau paraventriculaire (PVN) (Figure 8). Le noyau arqué contient des neurones orexigènes qui coexpriment le neuropeptide Y (NPY) et la protéine AgRP (Agouti-related protein) et des neurones anorexigènes qui coexpriment la proopiomelanocortine (POMC) et le transcrit CART (Cocaine and amphetamine Regulated Transcript). Ces deux populations neuronales exercent donc des fonctions opposées sur la régulation de la prise alimentaire et elles sont entre autres régulées par des signaux hormonaux périphériques comme la leptine. Les neurones NPY/AgRP sont inhibés par la leptine (Schwartz 1996) tandis que les neurones POMC/CART sont activés par celle-ci (Schwartz 1997).

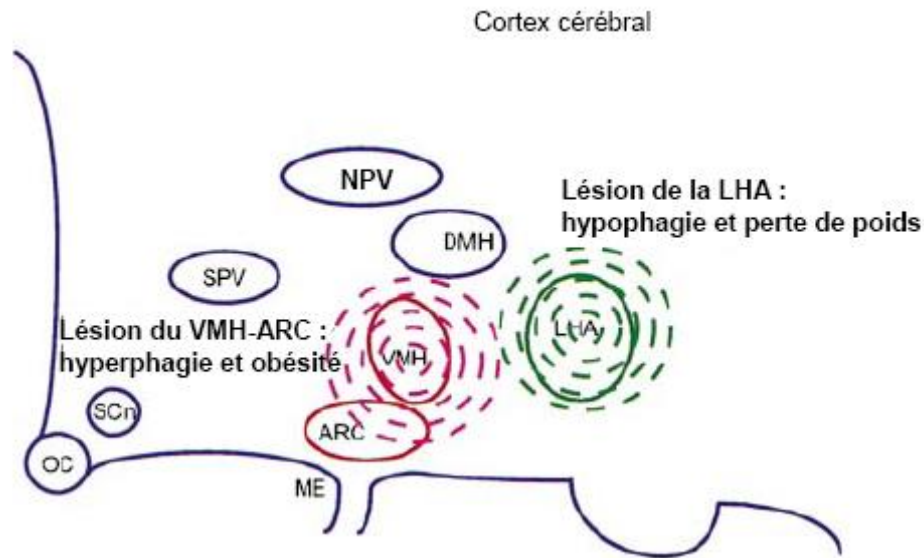


Figure 8 : Schéma d'une coupe sagittale d'hypothalamus de rat illustrant les deux centres hypothalamiques régulant la prise alimentaire. L'hypophagie et la perte de poids sont produites par une lésion de l'aire hypothalamique latérale (LHA, en vert) tandis que l'hyperphagie et l'obésité sont la conséquence d'une lésion du noyau ventromédian (VMH) et du noyau arqué ARC, en rouge). NPV : noyau paraventriculaire, DMH : noyau dorsomédian, ME : éminence médiane, SPV : zone subparaventriculaire, SCn : noyau suprachiasmatique, OC : chiasma optique. D'après Elias 1999

Le retard de croissance intra-utérin dû à une sous-nutrition maternelle pendant la gestation et la lactation est à l'origine des altérations de comportement alimentaire à l'âge adulte (Coupé 2009) avec des altérations de la cascade anorexigène chez le rat (Breton 2009) et une réduction du neuropeptide NPY dans le noyau arqué (Plagemann 2000) entraînant une hypophagie et une réduction du poids chez les rats. Au sein de notre laboratoire, deux études indépendantes ont montré que les rats mâles exposés à la restriction protéique présentaient une hyperphagie du sevrage à J35 résultant d'une prise alimentaire plus importante plutôt qu'une augmentation du nombre de repas (Coupé 2009, Orozco-Solis 2009).

Outre la restriction protéique, il a également été observé qu'une alimentation en excès chez des rats pendant la lactation entraînait une augmentation de la réponse inhibitrice des neurones du noyau centro-médian au NPY (Heidel 1999), à la leptine (Davidowa 2000) et à l'insuline (Davidowa 2001) ce qui entraînait une hyperphagie et un surpoids.

Il a également été montré que la leptine néonatale, adipokine dont nous détaillerons les caractéristiques ultérieurement dans cette partie, pouvait programmer la régulation de la balance énergétique, celle-ci pouvant avoir un impact sur la survenue de l'obésité et augmenter ainsi la prévalence à développer un syndrome métabolique.

Une étude menée chez des souris obèses *ob-/-* a montré qu'elles possédaient moins de projections de neurones NPY/AgRP et POMC/CART de l'ARC vers le NPV et que ce phénomène était réversible après l'injection de leptine en période néonatale. Une injection quotidienne de leptine de J4 à J12 (10mg/kg) permet en effet un rétablissement des projections émanant de l'ARC mais cette injection n'a aucun effet si elle a lieu à l'âge adulte. Cette étude établit donc le rôle essentiel de la leptine néonatale sur la mise en place des projections neuronales de l'ARC (Bouret 2004). Cependant ces résultats ont été pondérés par la suite, avec une étude montrant que la programmation de l'homéostasie énergétique n'était pas seulement due à la leptine mais également à d'autres facteurs comme l'insuline par exemple (Cottrell 2011).

En effet, outre la leptine, il a été montré que l'insuline jouait un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire. Son injection chronique entraîne une réduction de la prise alimentaire révélant son action anorexigène (Woods 1979). Les récepteurs à l'insuline sont en effet largement présents dans le SNC, en particulier au sein du noyau arqué de l'hypothalamus (Baskin 1988).

Deux études portant sur le comportement alimentaire ont également montré que la restriction protéique maternelle entraînait une hyperphagie des rats du sevrage au 35^{ème} jour (Coupé 2009, Orozco Solis 2009). A l'âge adulte, ces rats mangeaient plus vite et avaient des périodes d'inactivité plus longues entre les repas suggérant des effets à long terme de la programmation nutritionnelle sur le comportement alimentaire.

Outre l'augmentation de la prise alimentaire, le retard de croissance intra-utérin affecterait également la dépense énergétique en la diminuant. Les rats RCIU sont en effet beaucoup moins actifs à 35 jours mais aussi à l'âge adulte. Ce résultat est exacerbé lorsque le rat RCIU est nourri avec un régime hypercalorique (Vickers 2003). Il existe donc un déséquilibre important de la balance énergétique programmée par la restriction alimentaire pendant la gestation.

a-6- Le tissu adipeux

Des données basées sur des modèles animaux ont montré que la restriction nutritionnelle chez les mères pendant la période de croissance placentaire entraînait une augmentation du tissu adipeux fœtal (Bispham 2003).

Cette programmation du tissu adipeux a été retrouvée chez l'Homme au cours de la famine Hollandaise où l'exposition à une sous-nutrition durant le début de la grossesse était associée à la survenue d'obésité chez l'adulte et donc à un excès de stockage des lipides (Roseboom 2000), avec là encore une atteinte du nombre (hypertrophie) et de la taille (hyperplasie) des cellules adipocytaires.

En conclusion, la programmation nutritionnelle, illustrée par ces exemples, a un impact sur le développement d'organes clés jouant un rôle sur le métabolisme et donc sur la prédisposition au syndrome métabolique.

b. Les mécanismes physiologiques du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique a pour principales composantes des anomalies métaboliques comme nous l'avons vu précédemment avec des troubles de la tolérance au glucose, une insulino-résistance, une dyslipidémie, une obésité, une hypertension... conduisant à des complications cardiovasculaires ou diabétiques.

Plusieurs points dans la physiopathologie du syndrome métabolique ont été mis en relief, comme le lien étroit entre excès de graisse et résistance à l'insuline ou encore le rôle d'un déterminisme lié notamment à la programmation nutritionnelle et à l'effet de la nutrition périnatale sur la prédisposition au syndrome métabolique.

Mais cette physiopathologie du syndrome métabolique n'est encore que partiellement connue. Elle résulterait vraisemblablement de la conjonction de facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques. L'obésité abdominale associée à une inflammation chronique et à une résistance à l'insuline seraient les principaux processus pouvant expliquer les composantes du syndrome métabolique (Jullien 2008).

b- 1 Le tissu adipeux

Chez l'Homme et les animaux, le tissu adipeux (TA) est composé de plusieurs compartiments de stockage des graisses répartis dans des dépôts sous-cutanés et viscéraux (Cinti 2001).

Le tissu adipeux joue un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie du glucose (contrôle de l'appétit et de la sensibilité à l'insuline) et des lipides, mais aussi dans l'inflammation et l'athérogenèse.

Il est principalement composé d'adipocytes, de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes), de préadipocytes et de cellules endothéliales (Schenk 2008) (Figure 9).

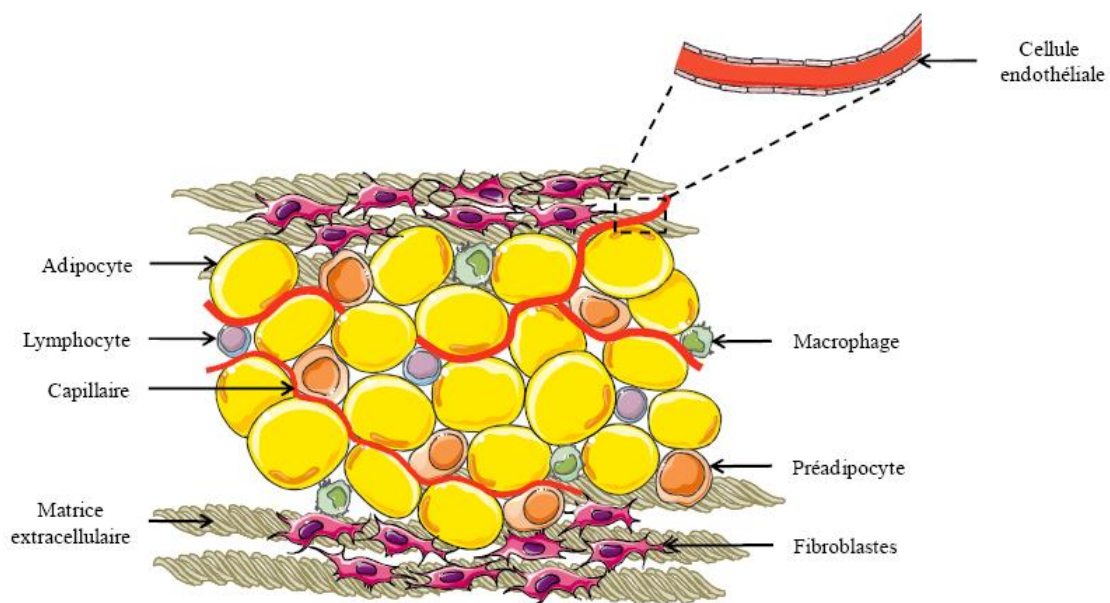


Figure 9: Schéma de la composition du tissu adipeux. D'après Shen 2003

Il existe deux types de tissu adipeux, le TA blanc et le TA brun. Le TA blanc est le principal lieu de stockage des graisses, de l'excès d'énergie provenant des aliments sous la forme d'acides gras (Cinti 2001).

L'obésité abdominale semble jouer un rôle central dans l'étiologie du syndrome métabolique en contribuant notamment à des troubles du métabolisme des lipides. L'obésité serait la meilleure marque de prédiction de la dégradation d'un ou plusieurs composants physiologiques du syndrome métabolique (Maison 2001).

Une étude longitudinale (Cameron 2008) suggère que l'obésité abdominale précéderait l'apparition des autres caractéristiques du syndrome métabolique comme la résistance à l'insuline pouvant aller jusqu'à la survenue d'un diabète de type 2 et l'apparition de

pathologies cardiovasculaires. Le diabète de type 2 est en effet associée dans plus de 80% des cas d'obésité qui est montrée comme un facteur de majoration de l'insulinorésistance (Kahn 2000). Dans un contexte d'obésité, une masse excessive de TA, plus particulièrement du TA viscéral, se forme par hypertrophie et hyperplasie des adipocytes associées à un mécanisme de lipolyse accrue permettant la libération d'acides gras et de glucose dans la circulation sanguine (Guilherme 2008, Coppack 2005, Coppack 2005). Cette libération massive des acides gras libres est connue pour jouer un rôle dans l'établissement de l'insulinorésistance (Bays 2004, McGarry 2002). Ces acides gras (AG) libres vont aller en priorité vers le foie participant à la synthèse accrue de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et donc à l'augmentation des triglycérides circulants. Ces perturbations du métabolisme des AG provoquent un dysfonctionnement endothélial à l'origine du processus d'athérogenèse via une augmentation des LDL-cholesterol athérogènes (Lau 2005). Mais cet excès d'AG libres diminue également l'apport en glucose au niveau du muscle, entraînant une diminution de la synthèse de glycogène et de l'oxydation du glucose associées à une lipotoxicité du muscle (Griffin 1999).

b- 2 La résistance à l'insuline

L'insulinorésistance est au cœur des mécanismes physiologiques du syndrome métabolique. L'insuline joue un rôle majeur dans l'utilisation et le stockage des substrats énergétiques (glucidiques ou lipidiques). Il s'agit d'une hormone sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques qui exerce en plus de son action hypoglycémiante connue, des effets sur le contrôle de la prise alimentaire assez proches de ceux de la leptine. Elle régule l'entrée de glucose dans le muscle, la synthèse du glycogène dans le foie, le stockage des lipides et la production d'acides gras dans le tissu adipeux. L'insuline joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la biodisponibilité des AG libres en régulant notamment l'activité de la lipoprotéine lipase. L'insuline inhibe la lipolyse et réduit par conséquent l'afflux des AG libres en augmentant la capacité de stockage des adipocytes. Ses rôles sont rendus possibles par sa fixation à son récepteur situé sur les cellules (hépatocytes, adipocytes et myocytes) de ses 3 tissus cibles (Capeau 2003).

L'insulinorésistance est une limitation de l'action de l'hormone sur ses tissus cibles à cause d'une perturbation de la voie de signalisation de son récepteur. Ceci s'accompagne au début d'une hyperinsulinémie permettant de préserver la tolérance au glucose. Cependant avec le

temps, l'augmentation des AG libres peut avoir un effet lipotoxique au niveau du pancréas entraînant un trouble de la sécrétion d'insuline conduisant à une détérioration de la tolérance au glucose (hyperglycémie). Cette intolérance au glucose est associée à la non utilisation du glucose par le muscle et à l'initiation de la néoglucogenèse et glycolyse conduisant à une hyperglycémie chronique. Une glycémie élevée augmente alors le risque de maladies cardiovasculaires, en augmentant les taux de cholestérol et de triglycérides endommageant les parois artérielles.

b- 3 La fonction endocrine du tissu adipeux

Outre sa fonction de stockage des lipides pour une utilisation à distance des repas, un nouveau rôle endocrinien du tissu adipeux a été mis en évidence. Le TA peut sécréter de nombreux peptides tels que des hormones ou des cytokines appelées adipokines. Elles régulent notamment le métabolisme énergétique, la prise alimentaire, la sensibilité à l'insuline et l'état inflammatoire de l'organisme. Dans une situation d'hypertrophie du TA relative au syndrome métabolique, il y a une grande variation des taux d'adipokines entraînant un état inflammatoire de bas grade ainsi qu'une altération de la sécrétion / utilisation des acides gras. Une augmentation de la masse grasse va influencer la capacité endocrinienne de l'adipocyte en affectant la sécrétion de plusieurs protéines comme la leptine.

La leptine fait partie de ces adipokines sécrétées. Elle agit sur le cerveau pour réguler la balance énergétique (dépenses vs apports) via ses récepteurs (ObR) en inhibant la voie orexigénique et en stimulant la voie anorexigénique au niveau de l'hypothalamus (Elias 1996). Physiologiquement, une augmentation du taux de leptine plasmatique indique au SNC que l'apport en nutriments est suffisant et qu'une augmentation des dépenses énergétiques est nécessaire. La leptine a donc un rôle anorexigène important.

L'impact de la leptine sur le comportement alimentaire a été mis en évidence grâce au développement de modèles génétiquement modifiés soit pour le gène de la leptine (souris ob/ob Zhang 1994), soit pour son récepteur (souris db/db Lee 1996). Il a été montré que ces lignées génétiquement modifiées développaient une obésité sévère et un diabète de type 2 à l'âge adulte.

Ce même phénotype est observé chez l'Homme lorsqu'il possède une mutation au niveau du gène de la leptine (Krude 1998).

Il a été montré que le TA exprimait lui aussi des récepteurs à la leptine suggérant une action autocrine de la leptine sur le TA (Tartaglia 1997). Il a d'ailleurs été montré qu'une inactivation spécifique du récepteur de la leptine dans le TA entraînait chez la souris l'apparition de caractéristiques du SM comme une augmentation de l'adiposité, une résistance à l'insuline, une hypertriglycéridémie... sans modifier pour autant la prise alimentaire. Ceci indique qu'une altération de l'action de la leptine sur le TA peut avoir des conséquences métaboliques engendrant la survenue d'un SM (Huan 2003).

De plus, dans un contexte d'obésité, il a été montré que les concentrations plasmatiques de leptine ainsi que l'expression de son ARNm dans le TA étaient étroitement liées au degré d'obésité (Frederich 1995, Zimmet 1996), en faisant donc un indicateur de la masse adipeuse (Fève 2006). Il a d'ailleurs été suggéré que l'hyperleptinémie due à un excès de TA pouvait être un élément clé du syndrome métabolique (De Courten 1997) (Figure 10). Ce taux élevé de leptine circulante associé à l'obésité entraîne comme pour l'insuline, une résistance à l'action de la leptine qui ne joue alors plus son rôle dans la suppression de la prise alimentaire et dans la perte de poids (Krechowec 2006). Cette résistance à la leptine passe également par l'inactivation de la voie de signalisation dépendante de son récepteur.

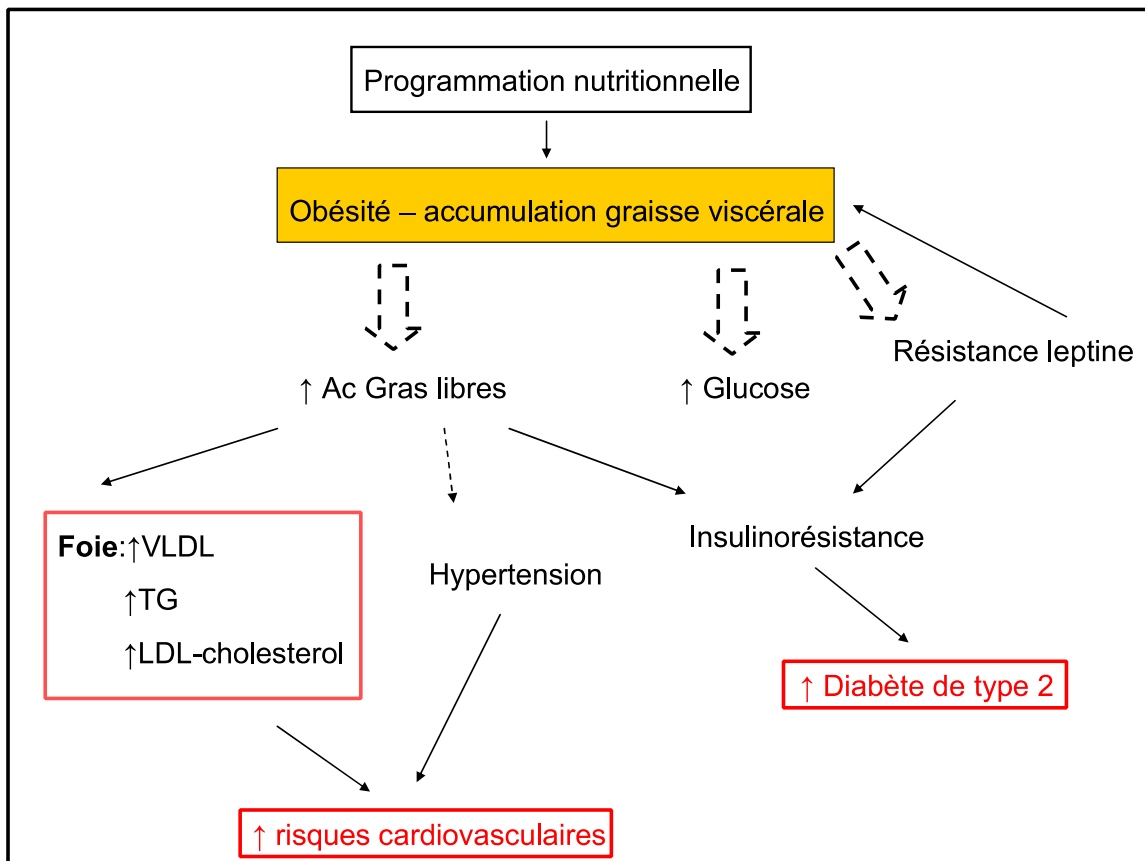


Figure 10: Schéma de la physiopathologie du syndrome métabolique

2- Les mécanismes moléculaires de la programmation nutritionnelle

Le syndrome métabolique touche de manière plus ou moins sévère des individus d'une même population ayant pourtant le même style de vie. Ceci suggère que les individus n'ont pas la même sensibilité face aux altérations métaboliques caractéristiques du SM.

De nombreuses études suggèrent que l'alimentation maternelle pendant la période périnatale pourrait sensibiliser au développement du syndrome métabolique. L'un des défis actuels est l'identification des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la programmation nutritionnelle. En effet, très peu de choses sont connues sur les cascades moléculaires engagées entre la nutrition périnatale et les modifications fonctionnelles/physiologiques conditionnant la susceptibilité à développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte. Grâce aux études récentes, l'implication de la régulation épigénétique dans la réponse de l'organisme face à des apports alimentaires inadaptés semble être un mécanisme probable même s'il reste encore beaucoup de choses à élucider.

Conrad Waddington a été le 1^{er} à introduire le terme d'épigénétique au début des années 40 (Waddington 1942). Il a défini l'épigénétique comme regroupant toutes les cascades moléculaires modulant l'expression des gènes conduisant à un phénotype particulier. Avec le temps, sa définition a évolué pour devenir celle que l'on connaît à savoir **l'étude des changements stables et héritables de l'expression des gènes sans modification de la séquence primaire de l'ADN**. En d'autres termes, l'épigénétique étudie les mécanismes de contrôle de la transcription des gènes responsables des variations observées en fonction du type cellulaire, ou en fonction du temps (pour une même population cellulaire).

Actuellement la communauté scientifique travaillant dans le domaine de l'épigénétique s'attache à étudier les modifications covalentes de l'ADN et post-traductionnelles des histones ainsi que les mécanismes par lesquels ces dernières influencent la structure de la chromatine et l'expression des gènes (Goldberg 2007) (Voir encadré [Méthylation de l'ADN et modifications d'histones](#)). En effet, l'ensemble de ces modifications épigénétiques va modifier les affinités entre histones et ADN ou protéines et ADN conduisant donc à des changements de la conformation de la chromatine qui favorise, ou non, l'accès des facteurs de transcription et donc l'expression des gènes (Borrelli 2008).

L'héritabilité épigénétique est fondamentale au niveau cellulaire car elle contribue dans l'organisme à la mémoire de l'identité des cellules. La méthylation de l'ADN évolue au cours du développement (Voir encadré [Evolution de la méthylation au cours du développement](#)) et est influençable par l'environnement comme par exemple la nutrition au même titre que les autres modifications épigénétiques. Notre mode de vie pourrait ainsi laisser dans nos cellules une "trace épigénétique" transmissible d'une génération à l'autre.

a- Les 1^{ères} preuves d'un lien entre nutrition et modifications épigénétiques

Le 1^{er} exemple, chez la souris, d'un gène soumis à l'impact de la nutrition via des modifications épigénétiques est le gène *Agouti*. Ce gène contrôle la production de mélanine au niveau de la peau pour donner la couleur au pelage des souris.

Les mutations dominantes du locus *agouti* comme A^{vy} (*viable yellow*), engendrent une obésité, une résistance à l'insuline, ainsi qu'une coloration jaune du pelage. Chez ces mutants, l'insertion d'une séquence transposable en amont du promoteur engendre une dérégulation de l'expression du gène *agouti* et provoque son expression ectopique conduisant à une modification du pelage des souris mutantes. La protéine a un rôle d'analogue de la mélanocortine bloquant la production de pigment noir et favorisant la pigmentation jaune. Outre ce pelage jaune, les souris mutantes développent une obésité tardive, ont un comportement alimentaire incontrôlé et une balance énergétique positive (Spiegelman 1996) conduisant au développement d'un diabète (Figure 11).

Le profil de méthylation de cette séquence d'ADN transposable est inversement corrélé à l'expression ectopique du gène et varie d'une souris isogénique A^{vy} à une autre causant des variations de couleur du pelage allant du jaune (séquence transposable non méthylée) au marron (séquence transposable méthylée) (Dolinoy 2008). Mais il a été montré que la supplémentation des mères gestantes en acide folique augmentait la proportion de souris au pelage marron et que ce changement était directement lié à l'augmentation du niveau de méthylation de la séquence transposable. Ces observations ont été les 1^{ères} à montrer un effet du régime alimentaire de la mère au cours de la gestation sur le phénotype de la descendance via des modifications épigénétiques (Wolff 1998).

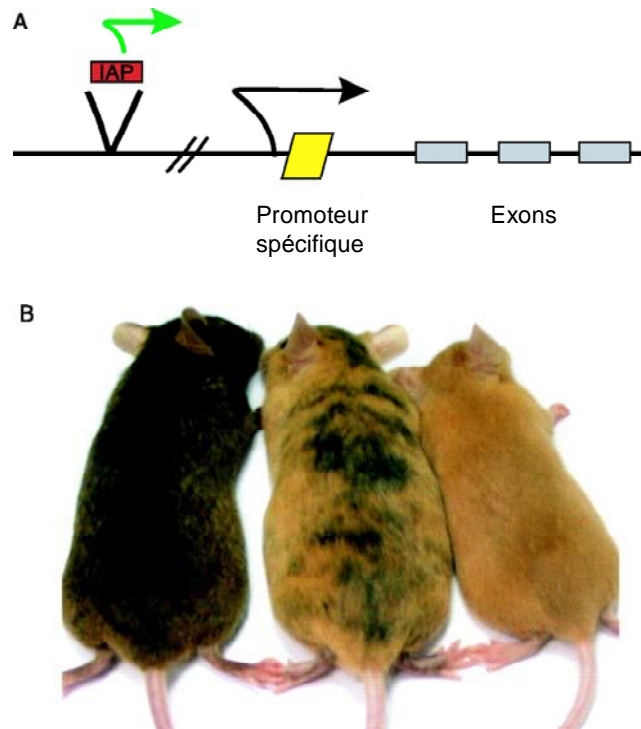


Figure 11: Allèles Agouti^{vy}. (A) Carte de l'allèle A^{vy}. L'allèle possède une séquence transposable en amont du promoteur du gène générant une expression ectopique du gène responsable de l'obésité des animaux. Sa méthylation entraîne l'activation du promoteur spécifique conduisant à un pelage marron. (B) Panel de souris isogénique A^{vy}. D'après Zamudio 2008

D'autre part, une étude portant sur des rattes gestantes sous restriction protéique a montré que ce régime induisait une hypométhylation des promoteurs du gène des récepteurs aux glucocorticoïdes (23%) et du gène PPAR α (21%) dans le foie des descendants quel que soit leur âge. Cette hypométhylation a été associée à une augmentation du nombre des ARNm de ces gènes (Lillicrop 2005, Burdge 2007).

L'augmentation de l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) au cours de la vie précoce est impliquée dans l'induction de l'hypertension (Bertram 2001, Phillips 1998), et l'altération de l'activité de PPAR α est associée à l'induction de la dyslipidémie (Burdge 2004).

Cette étude (Lillicrop 2005) a été la 1^{ère} à démontrer un effet de la restriction protéique durant la gestation sur la méthylation des promoteurs de ces deux gènes après le sevrage. La persistance de ce défaut de méthylation après le sevrage (où l'influence directe de la restriction maternelle a cessé), suggère que les modifications épigénétiques produisent des

effets stables sur l'expression de ces gènes. De plus, le fait que la méthylation du promoteur de PPAR δ ne soit pas affectée par cette restriction maternelle suggère une régulation épigénétique gène spécifique.

Il est important de noter que le récepteur aux glucocorticoïdes, au delà du fait d'être sensible à la nutrition maternelle via des mécanismes épigénétiques, est également sensible à l'attention que la mère porte à ses petits (Weaver 2004).

En effet, cette même équipe a pu observer que les profils de méthylation du promoteur du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe variaient significativement en fonction de l'attention et des soins apportés par la mère à ses petits au cours de la 1^{ère} semaine après la naissance. Les petits ayant une mère très attentionnée ont un taux de méthylation élevé pour ce gène et inversement pour les petits ayant eu peu de soins de la part de leur mère. Afin d'identifier si ces résultats pouvaient être corrigés, ils ont effectué des adoptions croisées dans les 12h après la naissance entre des mères attentionnées et des petits nés de mère n'apportant aucun soin et vice et versa. Ces adoptions ont annulé les différences de méthylation sur des sites CpG spécifiques et notamment en 5', suggérant que les variations d'attention et de soins des mères altèrent directement le profil de méthylation du promoteur du gène GR. Ils ont montré que cette altération du profil de méthylation apparaissait pendant le 1^{er} jour de vie.

Ces résultats ont été confirmés par des études démontrant que la 1^{ère} semaine de vie postnatale est une période critique, particulièrement sensible aux effets d'expériences précoces sur l'expression du gène GR dans l'hippocampe (Meaney 1996). Cette étude a apporté les 1^{ères} preuves qu'un comportement maternel produisait des altérations stables de la méthylation de l'ADN ayant des conséquences sur l'expression du gène à long terme et de manière irréversible.

D'autres modèles ont également mis en évidence une implication des mécanismes épigénétiques dans la programmation nutritionnelle. Un modèle basé sur la ligature des artères utérines chez le rat, induisant une diminution des apports fœtaux, a montré qu'il existait une diminution persistante de l'expression du gène Pdx1 médiée par une série de changements épigénétiques chez les rats RCIU sans changement de la masse de cellules β (Park 2008, Stoffers 2003). Par contre à l'âge adulte, ces RCIU présentaient une nette diminution de la masse de cellules β avec une expression de Pdx1 quasi absente (Stoffers 2003).

Pdx1 est un facteur de transcription pancréatique qui régule le développement du pancréas et la différenciation des cellules β . Une dérégulation de ce gène entraîne la survenue d'un diabète de type 2, de dysfonctions des cellules β (Brissova 2005, Holland 2005, Jonsson

1994), et des problèmes au niveau des îlots pancréatiques associés à une résistance à l'insuline (Brissova 2005, Kulkarni 2004).

Il a été montré que la limitation des apports en oxygène, en glucose ou en acides aminés avait pour effet une diminution d'expression de Pdx1 via une cascade de modifications épigénétiques aboutissant à l'inactivation du gène. Cette cascade touche le promoteur proximal de Pdx1 qui subit d'abord des modifications au niveau des histones pendant la période néonatale avec une perte de l'acétylation des histones H3 et H4, suivi à l'âge adulte par une méthylation *de novo* des îlots CpG. Ces modifications épigénétiques seraient liées à la survenue d'un diabète de type 2.

Une autre équipe s'est focalisée sur le gène HNF4 α qui est un facteur de transcription nécessaire à la différenciation des cellules β et à l'homéostasie du glucose (Odom 2004) et qui a été identifié comme étant lié au développement de certaines formes de diabète de type 2 (Silander 2004, Barroso 2008).

Cette étude a montré que la restriction protéique maternelle induisait une diminution d'expression du gène mais n'avait qu'un effet minime sur la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur proximal. Par contre, ils ont pu mettre en évidence que cette diminution d'expression du gène était due à une diminution au sein des îlots pancréatiques des marques d'histones actives (H3Ac et H3K4me1) et à un enrichissement des marques répressives (H3K9me2) modifiant alors l'interaction promoteur-enhancer par altérations du code histone (Ozanne 2011, Sandovici 2011) et ceci chez le rat jeune et l'adulte. Ils ont démontré que la restriction protéique maternelle programmait la réduction de l'expression d'HNF4 α dans les îlots pancréatiques à l'âge adulte et que cette diminution d'expression était corrélée à la survenue d'un diabète de type 2 (Gunton 2005).

Cet exemple est un bel exemple de coopération entre les marques épigénétiques permettant la variation d'expression de certains gènes (Voir encadré [Coopération entre les marques épigénétiques](#)), mettant ainsi en évidence la complexité des mécanismes de régulation épigénétique.

b- Lien entre nutrition, méthylation et mécanismes physiologiques

D'autres groupes ont choisi de se focaliser sur des mécanismes physiologiques déjà mis en évidence pour en connaître les mécanismes moléculaires sous jacents.

Une équipe a travaillé sur l'expression du gène de la leptine qui joue un rôle majeur de régulateur de la prise alimentaire et de contrôle de l'homéostasie énergétique (Jousse 2011). Ils ont constaté que dans le cadre d'une restriction protéique maternelle, les descendants avaient une diminution de leur poids et de leur masse grasse associée à une augmentation de leur prise alimentaire. Ces modifications persistaient jusqu'à l'âge adulte et étaient associées à une diminution du niveau plasmatique de leptine soulignant le fait que le régime alimentaire des mères affectait la balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique chez l'adulte.

Compte tenu de ces résultats, ils ont analysé le profil de méthylation du promoteur du gène de la leptine. Ils ont montré une hypométhylation des CpG localisés spécifiquement dans le promoteur de la leptine causant une forte induction de l'expression du gène en réponse à un repas.

Une autre étude menée sur de petites portées de rats mimant une surnutrition précoce a mis en évidence une dérégulation des circuits hypothalamiques (Plagemann 2009). Physiologiquement ces circuits impliquent la stimulation de l'expression de neurohormones anorexigènes comme la proopiomelanocortine (POMC) par la leptine et l'insuline circulantes. Ces deux hormones inhibent le neuropeptide Y (NPY) orexigène et contrôlent ainsi la prise alimentaire et la courbe de poids. La surnutrition précoce n'entraîne pas de variation d'expression du gène NPY ou de son taux de méthylation au sevrage malgré l'augmentation de la leptine et de l'insuline plasmatiques. Ceci suggérerait une véritable résistance du promoteur de NPY face à un défaut nutritionnel. Par contre, le promoteur de POMC présente une hyperméthylation au niveau des deux sites de fixation du facteur de transcription Sp1 qui est essentiel dans la médiation des effets de la leptine et de l'insuline sur l'expression du gène. Cette hyperméthylation entraîne donc une diminution d'expression de POMC malgré l'hyperleptinémie et l'hyperinsulinémie, augmentant ainsi le risque d'obésité ou de survenue de pathologies du syndrome métabolique comme le diabète ou les maladies cardiovasculaires (Plagemann 2009).

Dans la continuité de ces travaux sur POMC, notre laboratoire (Coupé 2010) a travaillé sur un modèle de retard de croissance intra-utérin induit par une restriction maternelle protéique suivie ou pas d'un rattrapage de croissance rapide après la naissance. Il a été montré une

grande variation, entre les groupes, du taux de méthylation dans l'hypothalamus pour un certain nombre de CpG oscillant entre 20 et 60%.

Ces résultats ont confirmé ceux obtenus par Plagemann (2009), suggérant que les périodes pré et post natales pouvaient influencer le pourcentage de méthylation sur certains CpG. Cette étude confirme également l'effet programmeur de la nutrition post-natale sur le niveau de méthylation du promoteur du gène POMC et démontre également l'existence d'une programmation *in utero*.

c- Lien entre nutrition, méthylation et gènes soumis à l'empreinte parentale

Il a également été mené de nombreuses études sur une catégorie de gènes bien particuliers et connus pour être régulés très finement par la méthylation de l'ADN : les gènes soumis à l'empreinte parentale (GSE) (Voir encadré [Empreinte génomique parentale](#)). Ces gènes sont connus pour exercer des fonctions diverses notamment dans la croissance foetale, le développement, la prolifération et le métabolisme cellulaire, en particulier dans l'embryon et le placenta. Des analyses ont mis en évidence l'existence d'un réseau de gènes soumis à l'empreinte qui sont impliqués dans le contrôle de la croissance embryonnaire, et qui seraient co-régulés au cours du développement (Varrault 2006).

Il était tentant de penser que leurs caractéristiques et leur régulation en faisaient des cibles particulièrement vulnérables face aux perturbations environnementales comme la nutrition par exemple (Jirtle 2007). Les GSE sont en effet regroupés au sein de larges domaines ou clusters. Ils présentent des séquences différenciellement méthylées en fonction de l'origine parentale, appelées DMR (Differentially Methylated Regions) et sont sous le contrôle de centres d'empreinte ou ICR (Imprinting Control Region). Ces séquences qui peuvent atteindre plusieurs kilobases sont riches en CpG et régulent l'expression monoallélique de l'ensemble des gènes du locus grâce à l'intervention de la méthylation de l'ADN. Cette dernière est requise pour contrôler l'expression mono allélique et est particulièrement sensible aux apports alimentaires

Il a été mis en évidence un réseau de GSE qui sont co-exprimés et co-régulés (Varrault 2006) et qui sont impliqués dans la régulation du développement d'organes clés, ils ont donc été proposés comme candidats jouant un rôle dans l'origine développementale de certaines

maladies liées à la programmation nutritionnelle (Charalambous 2007) (Voir encadré [Réseau de gènes soumis à l’empreinte](#)).

Un lien entre variation d’expression des GSE, via une modulation de la méthylation de l’ADN, et des pathologies liées à la programmation, a été montré au cours de l’étude de la cohorte de la famine Hollandaise (Tobi 2009, Heijmans 2008). En effet, une des rares opportunités d’étudier ce lien se présente dans l’étude des adultes exposés pendant leur période fœtale à cette famine de 1944-45. Une équipe de recherche (Heijmans 2008) s’est concentrée sur l’étude d’un des loci les mieux caractérisés au niveau de sa régulation épigénétique à savoir le locus contenant les gènes *Igf2* et *H19* (Voir encadré [Méthylation de l’ADN](#)). Le gène *Igf2* code le facteur de croissance IGFII qui joue un rôle clé dans la croissance et le développement fœtal (Smith 2006). Le gène *H19* code un ARN non codant dont la fonction n’est pas encore parfaitement élucidée mais qui est liée de façon très proche à la régulation du gène *Igf2*. Ces deux gènes présentent une expression mono allélique opposée puisque le gène *Igf2* est exprimé à partir de l’allèle paternel alors que *H19* est exprimé à partir de l’allèle maternel. L’empreinte parentale de ces deux gènes est maintenue grâce à des régions différenciellement méthylées (DMR) et les mécanismes régulant l’expression mono allélique des 2 gènes sont maintenant relativement bien compris. Cette équipe a mis en évidence une diminution de la méthylation de l’ADN au niveau des DMR d’*Igf2* liée à une exposition à la famine pendant la période périconceptuelle. Cette hypométhylation observée est comparable à celle retrouvée pour le gène *PPARα* chez les descendants de rattes gestantes sous régime restreint en protéines commencé avant la gestation.

Ces données issues de modèles animaux sont en accord avec l’hypothèse selon laquelle l’hypométhylation d’*Igf2* durant la famine serait due à une carence en donneurs de méthyl comme la méthionine (Waterland 2004). A contrario, cette hypométhylation des DMR d’*Igf2* n’est pas retrouvée pour les expositions à la famine durant la fin de la grossesse (Reik 2001) suggérant que les modifications épigénétiques sont particulièrement vulnérables durant le développement embryonnaire précoce qui est une période cruciale pour l’établissement et le maintien des marques épigénétiques (Voir encadré [Méthylation de l’ADN](#) et [Autres modifications épigénétiques](#))

Des travaux sur des modèles animaux ont par la suite confirmé cet impact de la nutrition sur le profil de méthylation des GSE. Une étude a montré que les rats nourris de manière excessive pendant l’allaitement présentaient une intolérance au glucose (Waterland 2004). Par microarrays, il a été identifié 10 gènes à expression variable dans les îlots pancréatiques entre

le groupe témoin et le groupe sur-nourri. Deux de ces gènes, *Ins2* et *neuronatin* sont des GSE. Comme les rongeurs ne possèdent que 0,5% de GSE (Murphy 2003), ces données renforcent l'hypothèse que les GSE soient sensibles épigénétiquement à la nutrition précoce (Waterland 2002). Une autre étude chez la souris a mis en évidence que même après le sevrage, la nutrition pouvait encore altérer l'expression monoallélique des GSE (Waterland 2004). En effet, une alimentation supplémentée avec un excès de méthionine, de choline, de Vitamine B12 et d'acide folique entraîne 60 jours après le sevrage une expression de l'allèle maternel d'*Igf2* normalement éteint (Waterland 2004). Cette expression perdure dans le temps même après passage à un régime alimentaire standard. Ces observations ont donc montré que de subtils changements dans le régime alimentaire après le sevrage pouvaient avoir des effets persistants sur la régulation des GSE. De plus si la nutrition précoce induit des altérations épigénétiques similaires sur les GSE de la lignée germinale, il est possible que celles-ci soient transmises à la génération suivante.

Une étude plus récente (Ivanova 2012) basée sur le modèle très connu de la restriction protéique maternelle a mis en évidence des résultats contradictoires à ceux présentés précédemment. Cette équipe s'est intéressée au profil de méthylation des DMR de 5 GSE et a montré que la restriction protéique maternelle durant la gestation ou la période postnatale précoce n'avait pas d'impact substantiel sur le niveau de méthylation des DMR de ces 5 GSE dans le foie des descendants. Il est possible que cet effet de la nutrition sur la méthylation de l'ADN soit tissu spécifique pour une ou plusieurs DMR, mais leurs résultats indiquent qu'il n'y a aucun effet en réponse à une restriction protéique maternelle majeure. Ils ont pu observer de légères augmentations de la méthylation au niveau des DMR des gènes *Grb10* et *Gnasxl* chez des animaux âgés de 3 semaines issus de mères soumis à une restriction protéique durant la gestation. Mais ces variations de méthylation n'affectent qu'un nombre très limité de CpG et ne sont pas maintenues à l'âge adulte. Malgré l'absence de non perturbation de la méthylation de l'ADN de ces GSE, leur expression a été décrite comme étant très affectée par la restriction protéique maternelle suggérant que ces perturbations d'expression pouvaient être causées par un autre mécanisme épigénétique que la méthylation de l'ADN.

Malgré ces résultats contradictoires, il semble important de continuer à mieux appréhender l'impact de la méthylation de l'ADN dans le mécanisme de la programmation nutritionnelle. Des équipes ont développé des modèles animaux basés sur une supplémentation ou une

restriction en micronutriments de la voie des mono carbonés. En effet, la méthylation de l'ADN est intimement liée au métabolisme des mono carbonés. Ceux-ci lui fournissent les groupements méthyl (Voir encadré [La voie des folates](#)) en présence de micronutriments comme le folate, la choline ou les vitamines du groupe B apportés par l'alimentation.

3- Les besoins en micronutriments liés à la grossesse : Quels nutriments ont un effet sur la régulation épigénétique ?

La grossesse est une période d'augmentation des besoins métaboliques due notamment aux changements physiologiques de la femme enceinte, du développement du fœtus et des annexes foeto-placentaires. Les micronutriments sont des déterminants majeurs de la santé de la future mère et du fœtus. Ces micronutriments sont des vitamines et minéraux essentiels pour stimuler la croissance et le métabolisme du fœtus (Tableau 5).

Tableau 5: Besoins en nutriments des femmes en âge de procréer (poids d'environ 60kg) et des femmes enceintes. D'après Costello 2004 et Mathews 2004

Energie, Nutriments (unités)	Besoins par jour	
	Femme en âge de procréer	Femme enceinte
Kilocalories	2200	2300/2400/2400
Protéines (g)	60	70
Glucides (g)	270	300
Lipides (g)	70	80
Fer absorbé (mg)	1,25	0,8/4,4/6,3
Ca (mg)	900	1000-1200
Magnésium (mg)	400	400
Zinc (mg)	10	14
Iode (µg)	100	150-200
Cuivre (mg)	1,5	2
Vitamine A (µg)	600	700
Thiamine (mg)	1,3	1,5 à 2
Riboflavine (mg)	2	2,5 à 3
Pyridoxine (mg)	2	2,5
Acide folique (µg)	400	800
Cobalamine (µg)	3	4
Vitamine C (mg)	110	120
Vitamine D (µg)	5-10	10-15
Vitamine E (mg)	12	12

La carence en fer peut conduire à une anémie qui augmente significativement le risque de décès dû à une hémorragie lors de l'accouchement. D'autres carences ont également été associées à des complications durant la grossesse que nous détaillerons plus loin.

Il existe une classe bien particulière de facteurs nutritionnels connus pour jouer un rôle important sur le développement fœtal: **les composés de la voie des folates**.

Ces composés ont été très étudiés pour leurs effets sur la prévention des malformations fœtales et leurs effets bénéfiques sont largement admis. Cependant leurs effets potentiels sur d'autres processus physiologiques sont encore très peu connus dans l'espèce humaine. Pourtant, de plus en plus de travaux sur des modèles animaux montrent que ces composés agissent sur la mise en place et la régulation des mécanismes épigénétiques pouvant être impliqués dans le processus de programmation nutritionnelle.

L'acide folique, la méthionine, le zinc, la bétaine, la choline, les vitamines B2, 6 et 12 sont en effet des cofacteurs essentiels de plusieurs réactions biochimiques permettant le transfert d'unités monocarbonées. Leur variation peut influencer plusieurs mécanismes distincts ayant des conséquences sur l'altération de la biosynthèse de l'ADN, la perturbation des réactions de méthylation et l'accumulation d'homocystéine à des niveaux toxiques.

Cette hyperhomocystéinémie correspond à un niveau anormalement élevé d'homocystéine dans le sang largement connu pour conduire à différentes pathologies des maladies cardiovasculaires et des thromboses (Cattaneo 1999). L'homocystéine est méthylée en méthionine par le transfert d'un groupement méthyl du méthyltetrahydrofolate, réaction catalysée par la méthylentetrahydrofolate réductase (MTHFR) (Ueland 1992). L'hyperhomocystéinémie peut être due à une carence en vitamine du groupe B (Miller 1994) ou à des variants génétiques touchant la 5-MTHF réductase associés à une réduction de son activité enzymatique augmentant ainsi les taux d'homocystéine plasmatique.

La dérégulation du cycle des folates lors de la gestation influence également la régulation épigénétique d'un certain nombre de gènes, en particulier des gènes liés au métabolisme énergétique et à la croissance fœtale et peut ainsi contribuer à l'établissement d'une empreinte nutritionnelle périnatale. Ceci suggère un rôle majeur du cycle de l'acide folique dans le processus de programmation. Plusieurs équipes ont ainsi testé l'effet de régimes déficients en divers composés de cette voie et ont montré qu'une carence en acide folique, ou un excès de méthionine, réduisait le poids maternel et fœtal, augmentait l'homocystéinémie maternelle et perturbait le métabolisme fœtal. Des effets sur le niveau de méthylation global du génome sont observés (McKay 2011) mais la méthylation de sites (= îlots) CpG de promoteurs spécifiques est également perturbée (Lillycrop 2005, Hoyo 2011).

a- L'acide folique

L'acide folique est une vitamine du groupe B (Vitamine B9). Sa carence est extrêmement fréquente au cours de la grossesse et peut avoir des conséquences sur le déroulement de la grossesse et sur le développement du fœtus comme nous le verrons ci-dessous.

Il se trouve que l'apport d'acide folique pourrait ne pas être assuré uniquement par l'alimentation, même équilibrée.

Le défaut de fermeture du tube neural (DFTN) est une anomalie grave qui est souvent mortelle. Ce DFTN concerne environ 1 grossesse sur 1000 en France et peut conduire à des interruptions de grossesse volontaires ou spontanées. Ce défaut se met en place au cours des 3-4 premières semaines de vie au moment même où la femme ne sait pas encore qu'elle est enceinte. Le rôle particulier de l'acide folique dans ce DFTN a été mis en évidence en 1964

(Hibbard 1964) avec une atteinte de son métabolisme chez les mères d'enfants porteurs de myéloméningocèles.

Une 10^{aine} d'années plus tard, une étude a montré une baisse des folates érythrocytaires au 1^{er} trimestre de la grossesse chez ces mères (Smithells 1976).

De 1981 à 1996, plusieurs études ont démontré que cette anomalie pouvait être corrigée par une supplémentation en acide folique avant même le début de grossesse. En effet, il semblerait que le DFTN serait dû à un défaut d'activité de la méthionine synthétase qui transforme l'homocystéine en méthionine en transférant un groupement méthyl produit par l'acide folique. Un défaut de cette enzyme conduit donc à un excès d'homocystéine qui serait la cause du défaut de fermeture du tube neural (Yang 2013).

Il a également été démontré que d'autres anomalies comme les malformations cardiaques, les fentes labio-palatines pouvaient être évitées avec une supplémentation en acide folique (Czeizel 1993, Antony 2000).

Ces données ont conduit dès 1992 plusieurs pays à préconiser la supplémentation systématique de toutes les femmes en période périconceptuelle d'une dose journalière de 400µg d'acide folique par voie orale.

Pour aller encore plus loin, en 1996, la Food and Drug Administration (FDA) a encouragé l'enrichissement en acide folique des produits céréaliers destinés à la consommation humaine (comme les farines) pour finir par le rendre obligatoire en 1998.

Depuis 2000, des publications américaines et canadiennes ont montré l'efficacité de cet enrichissement des farines en acide folique. L'incidence du DFTN a été en effet réduite de 30% aux Etats-Unis (Honein 2001, Williams 2002).

Malgré ses bénéfices évidents, cette supplémentation générale a engendré des préoccupations avec l'augmentation possible du risque de cancers du sein ou du colon et d'une détérioration cognitive chez les personnes âgées (Fife 2011).

Cette supplémentation a également des effets sur les mécanismes de régulation épigénétique. En effet, cette supplémentation a généralement été associée à une augmentation de la méthylation de l'ADN, et vice versa pour la restriction en acide folique. Des études ont été menées afin d'évaluer les effets d'un régime maternel supplémenté ou restreint en acide folique sur la méthylation globale. Il a été observé dans un modèle murin que les descendants exposés à une nutrition maternelle restreinte en acide folique pendant la gestation et la lactation montraient une diminution de la méthylation globale dans l'intestin des adultes (McKay 2011).

De la même manière, une supplémentation *in utero* a été associée à une hypométhylation des CpG chez les rats âgés de 28 semaines (Ly 2011). Ces données animales *in vivo* suggèrent un lien entre hypométhylation globale et acide folique qu'il soit en restriction ou en excès.

Une étude basée sur un régime alimentaire maternel restreint en protéines (Lillicrop 2005) a montré que cette restriction durant la gestation engendrait une diminution spécifique du pourcentage de méthylation des gènes PPAR α et GR dans le foie des descendants au sevrage. Cette hypométhylation persistait même après le sevrage alors que l'exposition à la restriction protéique avait cessé, suggérant donc l'implication de modifications épigénétiques stables dans la régulation de ces gènes. Cette hypométhylation a également été associée à une augmentation substantielle de l'expression des ARNm de ces gènes. Mais cette hypométhylation est réversible via une supplémentation en acide folique suggérant qu'un changement du profil de méthylation peut refléter un défaut du taux d'acide folique chez la mère.

Des études chez l'Homme ont également investigué le rôle de l'acide folique maternel dans la méthylation de l'ADN chez les descendants. Une étude transversale ciblant le gène *Igf2* (gène soumis à l'empreinte parentale) chez des femmes enceintes a montré une hypométhylation du promoteur d'*Igf2* dans les leucocytes du sang de cordon inversement associée à la supplémentation en acide folique durant la grossesse (Hoyo 2011).

b- Méthionine

La méthionine est un acide aminé essentiel qui est continuellement régénéré grâce au métabolisme des monocarbones et ce via l'homocystéine pour servir de précurseur à la S-adénosylméthionine (SAM). La fluctuation du niveau de méthionine dans l'alimentation a un effet potentiel sur la méthylation de l'ADN. En effet, la méthionine a un rôle important de donneur de groupement méthyl suggérant qu'une dérégulation par prise excessive de méthionine pourrait affecter la méthylation de l'ADN et donc causer une dérégulation de l'expression de gènes cibles.

Plusieurs projets ont été menés pour connaître les effets d'une prise excessive de méthionine sur la SAM et SAH hépatique.

Une étude menée en 1990 (Finkelstein 1990) portant sur des rats adultes soumis à des régimes alimentaires contenant des quantités de méthionine croissantes (0,3 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 3%) n'a pas

mis en évidence de changement dans la concentration hépatique de méthionine même pour le régime alimentaire le plus riche en méthionine, illustrant l'excellente homéostasie de la méthionine. Il en est de même pour les concentrations de SAM et SAH avec une élévation pour le régime à 3% de méthionine.

Dans cette étude, aucune toxicité de la méthionine n'a été observée jusqu'à ce que la concentration de méthionine augmente à 3%.

A contrario, une autre étude (Regina 1993) menée sur la toxicité de la méthionine a montré qu'une prise de méthionine à 1,5% dans l'alimentation entraînait une augmentation de la concentration de méthionine dans le foie mais également dans le plasma et une diminution du taux de croissance chez les jeunes rats. Dans le foie, cet apport de méthionine à 1,5% augmentait les concentrations de SAM (7 fois) et de SAH (4 fois). Ces résultats ont permis de conclure à une hépatotoxicité de la méthionine pouvant résulter d'une réaction de méthylation incontrôlée causée par une accumulation de SAM hépatique.

Il a été avancé que ces résultats contradictoires sur les effets d'un apport excessif de méthionine dans l'alimentation pourraient être dus à la composition spécifique du régime qui diffère entre les deux études (acide aminé vs caséine).

Néanmoins, ces résultats mettent en relief la complexité des effets potentiels d'une supplémentation en méthionine.

Très peu d'études ont regardé les effets d'une prise excessive de méthionine sur la méthylation de l'ADN. Ces études (Tremolizzo 2002, Devlin 2004) n'ont pas montré d'effet massif de la supplémentation en méthionine sur la méthylation de l'ADN mais ces résultats n'excluent pas de potentiels effets sur la méthylation de CpG spécifiques dans des tissus spécifiques et à des temps spécifiques.

c- Choline et bétaine

La choline est un composant diététique crucial pour maintenir des fonctions cellulaires normales. C'est en effet un précurseur des phospholipides qui sont des constituants majeurs des membranes cellulaires jouant donc un rôle important dans l'intégrité structurale des membranes cellulaires.

La choline est également un précurseur de la bétaine qui est nécessaire à une fonction rénale glomérulaire normale. La choline, via la bétaine, est également un donneur de méthyl indirect

à l'homocystéine pour maintenir l'homéostasie de la méthionine. Le métabolisme de la choline est donc étroitement lié au cycle des folates.

Le lait, les œufs et la viande sont les principales sources de choline alors que les plantes en sont pratiquement dépourvues (Tableau 6).

Tableau 6: Pourcentage de Choline dans certains aliments (Zeisel 1994)

Food	Concentration $\mu\text{mol/kg}$
	Choline
Apple	27
Banana	240
Beef liver	5831
Beef steak	75
Butter	42
Cauliflower	1306
Corn oil	3
Coffee	90
Cucumber	218
Egg	42
Ginger ale	2
Grape juice	475
Iceberg lettuce	2930
Margarine	30
Milk (bovine, whole)	150
Orange	200
Peanut butter	3895
Peanuts	4546
Potato	511
Tomato	430
Whole wheat bread	968

La perturbation du métabolisme de la choline et notamment sa carence a des conséquences nombreuses. Elle entraîne des lésions musculaires, l'accumulation de gras dans le foie et la mort de cellules hépatiques chez la plupart des hommes et des femmes ménopausées (da Costa 2005, 2004, Zeisel 1991). L'accumulation de gras dans le foie est due à la synthèse de lipoprotéines de très faible densité qui sont nécessaires à l'emballage des triglycérides qui sont ensuite sécrétés par le foie (Noga 2003). La mort des cellules hépatiques est quand à elle due à des dysfonctions mitochondriales, une fuite des radicaux libres et à une apoptose (Albright 2005, Holmes-McNary 2001).

La choline est aussi importante pour les fonctions placentaires chez la femme enceinte. Une supplémentation en choline augmente les mécanismes responsables de l'angiogenèse placentaire et diminuerait les risques de pré-éclampsie (Jiang 2012).

L'épigénome du placenta est particulièrement sensible à la prise de choline, par exemple, la supplémentation altère la méthylation de l'ADN et l'expression placentaire de la corticotropine qui est une hormone régulatrice de la réponse au stress (Jiang 2012). Ces résultats suggèrent qu'une faible prise maternelle de choline aurait des effets délétères sur la réponse au stress de la mère et du fœtus.

La choline est tout particulièrement importante dans le développement fœtal. Aux Etats unis, des mères ayant un apport restreint en choline avaient des risques significativement plus importants de donner naissance à des bébés présentant un défaut de fermeture du tube neural (Shaw 2006).

Chez le rongeur, la prise maternelle de choline durant la gestation influence le développement de l'hippocampe du fœtus et la mémoire du petit par des altérations de la neurogenèse (Craciunescu 2003).

De plus, des études récentes ont montré que la supplémentation en choline durant la période néonatale pouvait avoir des effets bénéfiques à long terme sur le cerveau. Chez le rongeur, des variations du métabolisme de la choline durant cette phase critique qu'est le développement foetal causent des changements à long terme sur la structure et la fonction du cerveau (Zeisel 2006). Chez le rongeur adulte, la mémoire décline avec l'âge, mais l'exposition à une forte dose de choline *in utero* empêche ce déclin de la mémoire (Meck 2003). Cette supplémentation module l'expression de gènes impliqués dans les fonctions de mémoire et d'apprentissage via la méthylation de l'ADN (Mellott 2007).

Cette supplémentation entraîne également une diminution du niveau de folate hépatique total d'environ 31% après 2 semaines de régime alimentaire déficient en choline (Selhub 1991). Un déficit en choline a également un impact sur la fonction rénale entraînant notamment une réabsorption de l'eau et une excrétion de sodium glomérulaire.

Le lien entre la restriction en choline, source de donneur de méthyl, et la méthylation de l'ADN a été étudié et a mis en évidence une hypométhylation globale significative dans le cerveau des souris en période foetale (Niculescu 2006).

d- Zinc

Le zinc est impliqué dans le cycle des folates au sein de la réaction de transformation de l'homocystéine en cystathionine. Il a été montré qu'un régime maternel déficient en zinc génère des effets néfastes allant de l'infertilité, à des défauts de développement, à la mort embryonnaire/fœtale et au RCIU. Des complications post-natales peuvent également avoir lieu incluant des anomalies de comportement et une augmentation de la pression artérielle chez les petits (Uriu-Adams 2010). Ce déficit en zinc entraîne une diminution des niveaux de méthylation de l'ADN et des histones (Breksa 2002) mais tout ceci reste largement méconnu.

e- Vitamines B2, 6 et 12

Ces vitamines sont importantes de par leur rôle catalytique dans le métabolisme des folates et des monocarbones. Un modèle *in vivo* montre qu'une restriction en vitamine B12 associée à une alimentation supplémentée en folate entraîne une hypométhylation globale du placenta en comparaison d'une alimentation supplémentée exclusivement en acide folique. Ceci suggère que des interactions entre les micronutriments peuvent altérer le profil de méthylation de manière plus importante que la restriction ou la supplémentation en un seul composé (Kulkarni 2011).

Deux études épidémiologiques ont étudié le rôle de la vitamine B12 dans la régulation de la méthylation de l'ADN. Une étude transversale a montré que le profil de méthylation d'*Igf2* dans le sang de cordon était inversement corrélé au taux sérique de vitamine B12 maternelle (Ba 2011). La seconde étude a étudié la relation entre les taux plasmatiques de Vitamines B2, B6 et B12 et la méthylation de l'ADN chez des fumeurs (Vineis 2011). Chez les fumeurs, ils ont observé une augmentation de la concentration de vitamine B12 qui était associée à une diminution du niveau de méthylation de certains gènes impliqués dans différentes pathologies.

En conclusion, nous pouvons aisément affirmer qu'un régime alimentaire inadéquat pendant la grossesse entraîne un apport insuffisant de plusieurs éléments nutritifs comme les micronutriments de la voie des folates et peut avoir de nombreuses conséquences physiologiques et épigénétiques chez la mère, le fœtus et le nouveau-né. Une approche somme toute très classique pour améliorer le statut nutritionnel de la femme enceinte est la supplémentation en ces micronutriments. Mais des études portant sur des modèles animaux ont montré que la supplémentation via l'alimentation maternelle en bêtaïne, choline, acide folique, méthionine et vitamine B12 pouvait affecter l'établissement du profil de méthylation

de l'ADN et altérant ainsi l'expression des gènes et *in fine* altérer également le phénotype de la descendance (Waterland 2003, Sinclair 2007)

4- Supplémentation avec de multiples donneurs de méthyl

Comme nous l'avons vu plus haut, l'étude du gène A^{vy} (Duhl 1994) chez la souris a montré qu'une supplémentation maternelle en donneurs de méthyl entraînait une hyperméthylation de ce gène ayant des conséquences sur la couleur du pelage des souris.

Une autre étude basée sur une supplémentation en donneurs de méthyl sur des souris avant et pendant la gestation a montré un impact sur la morphologie de la queue des petits. En effet, approximativement 70% des individus témoin étaient affectés par cette « torsion » de leur queue alors que seulement 40% des petits issus de mères supplémentées en donneurs de méthyl présentaient cette malformation. Il a été observé que cette supplémentation augmentait le niveau de méthylation de l'ADN au niveau du gène $Axin^{Fu}$ (Waterland 2006), et réduisait ainsi l'incidence de survenue de « torsion » au niveau de la queue des descendants. Cette hyperméthylation a été retrouvée uniquement au niveau de la queue. Ces résultats ont suggéré que l'établissement embryonnaire de la méthylation de l'ADN sur des allèles métastables est généralement sensible à l'apport maternel en donneurs de méthyl avant et pendant la gestation.

Mais très peu d'études ont été menées sur une supplémentation en multiples composés, permettant ainsi une étude plus complète en maximisant les effets physiologiques et moléculaires (Keith 2001, Sole 2002). Pourtant une supplémentation en multiples micronutriments pendant la gestation/grossesse pourrait être une stratégie très prometteuse dans la réduction des effets d'une alimentation inappropriée pendant la gestation (Allen 2005, Bhutta 2008).

Parmi les quelques rares études épidémiologiques existantes, une étude menée sur une population de femmes enceintes africaines infectées par le VIH a montré qu'une supplémentation en plusieurs micronutriments augmentait de manière significative le poids de naissance (Allen 2009).

Plus récemment (Ramakrishnan 2012), il a été montré que la supplémentation multiple chez la femme enceinte était efficace dans la diminution du risque de survenue de petit poids de naissance et/ou de petit poids par rapport à l'âge gestationnel. Mais il a été également montré

que si cette supplémentation était reçue après le 1^{er} trimestre elle avait pour conséquence une augmentation du risque de décès néonatal.

Une étude s'est penchée sur les effets de la supplémentation en multi-micronutriments sur les gènes soumis à l'empreinte que l'on connaît pour être régulés via des mécanismes épigénétiques et qui sont largement impliqués dans le développement fœtal (Cooper 2012). Il a été observé une méthylation différentielle suite à la supplémentation mais de façon sexe spécifique. En effet, chez les filles, le profil de méthylation variait pour le gène *Igf2R* alors que chez les garçons il variait pour le gène *Gtl2*. Ce profil de méthylation perturbé de manière sexe dépendant a été observé auparavant suite à une période de famine (Tobi 2009). Les mécanismes de réponse à cette supplémentation pourraient se mettre en place durant une fenêtre critique pendant laquelle la méthylation des DMRs survient suite à l'effacement (Voir encadré [Evolution de la méthylation de l'ADN au cours du temps](#)). Cependant sur un prélèvement de sang effectué chez ces bébés à 9 mois aucun défaut de méthylation n'a été retrouvé. Ceci peut éventuellement être expliqué par le faible nombre d'individus dans la cohorte et par le fait que ces profils sont probablement tissu spécifique.

La dernière étude publiée chez la souris (Carlin 2013), utilisant une supplémentation en composés de la voie des folates sensiblement identique à celle utilisée dans le cadre de mon projet de thèse a montré que la supplémentation en donneurs de méthyl annulait l'hypométhylation globale induite par le régime alimentaire gras des mères durant la gestation et la lactation. Les auteurs ont voulu dans un second temps évaluer l'innocuité de la supplémentation en donneurs de méthyl indépendamment d'un régime gras. Ils ont montré une augmentation de l'activité locomotrice des descendantes femelles nées de mères supplémentées et un risque accru de développer une obésité via la promotion d'un gain de poids. Ce résultat soulève la question des suppléments divers en composés de la voie des folates qu'ils proviennent directement de l'alimentation ou de la prise de compléments nutritionnels. En effet cette multiplicité de sources de divers composés peut aboutir à un excès de donneurs de méthyl et des doses supraphysiologiques peuvent avoir un effet sur le développement fœtal même si ces effets sont encore peu clairs et qu'une étude physiologique et épigénétique semble donc nécessaire pour confirmer les mécanismes physiologiques et moléculaires engagés.

De nombreuses recherches sont nécessaires pour tenter d'expliquer les mécanismes activés par une supplémentation en multiples micronutriments, pour déterminer les gènes ou régions du génome affectés par ces mécanismes, et les interactions potentielles entre ces nutriments.

Pour investiguer au mieux ces différentes questions, il semble que le foie soit un organe de choix. En effet, la moitié de la méthionine apportée par l'alimentation est utilisée par le foie pour créer la SAM nécessaire aux réactions de méthylation faisant de celui-ci un organe extrêmement sensible aux variations d'apports de donneurs de méthyl par l'alimentation (Mehedint 2013).

ENCADRÉS

Le cycle des Folates

Les folates désignent l'ensemble des molécules qui ont pour structure de base l'acide folique ou vitamine B9. Sa forme active est sa forme réduite : le tétrahydrofolate (THF) (Schirch

1989). Leur rôle physiologique est de fournir des unités monocarbonées nécessaires à des réactions métaboliques comme la conversion de l'homocystéine en méthionine. Cette réaction est rendue possible grâce à la méthionine synthase (réaction 8) et au THF qui joue un rôle de donneur et d'accepteur de groupements méthyl.

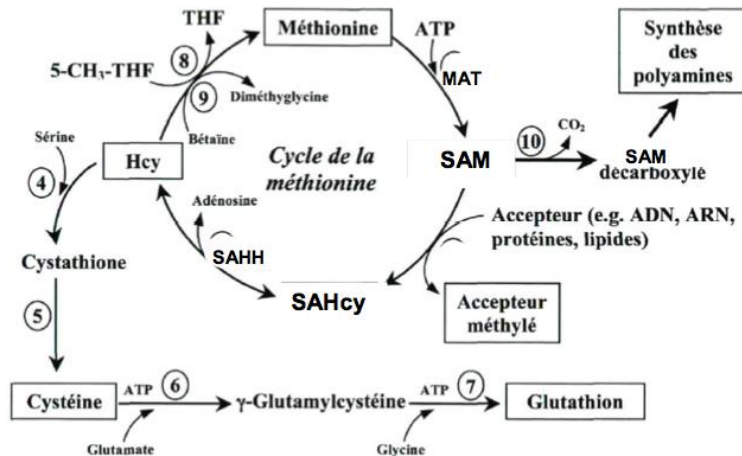


Figure : Le cycle des folates.

SAM, S-adenosylméthionine

MAT, méthionine adényltransférase

SAHH, S-adenosylhomocystéine hydrolase ;

SAHcy : S-adenosylhomocystéine

Hcy, homocystéine ; THF, tétrahydrofolate

Cette réaction est irréversible et est impliquée dans la synthèse de S-adenosylméthionine (SAM) à partir de la méthionine permettant d'alimenter les réactions de méthylation. En effet, la SAM est utilisée comme donneur universel de groupements méthyl. Ces réactions sont assurées par des méthyltransférases qui transfèrent les groupements méthyl de la SAM sur des molécules acceptrices comme l'ADN. Au cours de cette réaction, la SAM donnera la S-adenosylhomocystéine qui sera hydrolysée en homocystéine (Hcy) et en adénosine par la S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAHH) (Figure réaction 3). Cet ensemble de réaction est appelé la transméthylation. L'Hcy se trouve ensuite à un carrefour de deux voies métaboliques. Elle peut être recyclée en méthionine par la méthionine synthase (réaction 8) ou par la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) (réaction 9) qui utilisent respectivement comme donneur de méthyle le Methyl Tetra Hydrofolate (MTHF) ou la bétaine. L'homocystéine peut également être transformée de manière irréversible en cystéine (voie de la trans-sulfuration) pour la production entre autres de glutathion (réaction 4 à 7).

Le cycle des folates est donc très impliqué dans toutes les réactions de méthylation puisqu'il fournit les groupements méthyl nécessaires à ces réactions. Les réactions de méthylation de l'ADN et des histones dépendent de ce cycle, qui joue donc un rôle majeur dans les mécanismes épigénétiques. D'autre part, étant donné que de nombreux composés impliqués dans ce cycle sont fournis par l'alimentation, ce cycle apparaît comme un carrefour majeur de l'influence de l'environnement nutritionnel sur la régulation épigénétique du génome.

La méthylation de l'ADN

Il s'agit d'une marque épigénétique réversible associée à la répression de la transcription (Klose 2006). La réaction, catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMT), consiste en l'ajout d'un groupement méthyl fourni par la S-adenosylméthionine (SAM) sur une cytosine d'un dinucléotide CG pour donner une méthylcytosine (Herman 2003). Chez les Mammifères, la famille des DNMTs est divisée en 3 classes (Figure 10) : DNMT1, DNMT2 et DNMT3

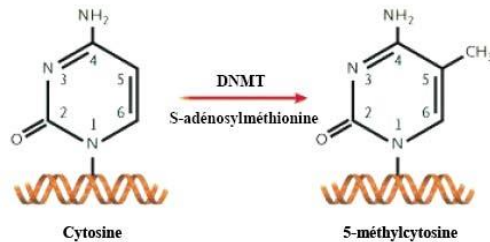


Figure: Réaction de méthylation de la cytosine. (Herman 2003)

La fréquence des dinucléotides CpG dans le génome est nettement inférieure à la fréquence attendue théoriquement sauf dans les îlots CpG où ils ont tendance à être concentrés. Ce phénomène serait dû à une hypermutabilité des cytosines méthylées qui pourraient se transformer en thymines par désamination (Herman 2003). Ils se retrouvent le plus fréquemment dans les régions promotrices des gènes avec un contenu en G et C d'au moins 55% sur une longueur de plus de 200 paires de bases et d'une fréquence de dinucléotides CpG supérieure à 0.65. (Costello 2002). Environ la moitié des gènes des mammifères possède un îlot CpG le plus souvent au niveau de leur promoteur et de leur 1^{er} exon. L'analyse de la séquence du génome humain a permis de détecter 29000 îlots CpG (Lander 2001, Venter 2001). De manière générale, 60 à 80% des dinucléotides CpG sont méthylés et ceux situés dans les îlots CpG le sont moins fréquemment.

La méthylation a été proposée comme étant un mécanisme majeur de la régulation de l'expression des gènes. Les mécanismes mis en jeu reposeraient sur la modulation des interactions entre ADN et protéines. L'un des mécanismes consiste à empêcher des protéines de se fixer à l'ADN via la reconnaissance de séquences contenant des dinucléotides CpG. Par exemple, la protéine CTCF (*CCCTC-binding factor*) qui bloque les interactions entre enhancer et promoteur par sa fixation sur l'ADN est dans l'incapacité de se fixer sur les sites CpG méthylés. L'enhancer pourra alors activer le promoteur et donc activer la transcription du gène. Un autre mécanisme implique la famille des protéines MBD (*methyl-binding domain*) comptant 5 membres : MeCP2, MBD1, 2, 3 et 4. Ces protéines peuvent se lier à l'ADN méthylé et sont impliquées dans la répression transcriptionnelle par leur interaction avec des complexes co-répresseurs contenant des Histones déacétylases (HDACs) via un remodelage chromatinien.

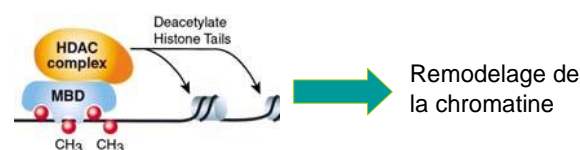


Figure : Formation de régions chromatiniennes fonctionnellement inactives via les MBD et les HDACs.

Evolution de la méthylation au cours du développement

La méthylation du génome est extrêmement dynamique et flexible au cours du développement embryonnaire et foetal. Deux vagues successives et distinctes de déméthylation-reméthylation ont lieu au cours de la gamétogenèse et après la fécondation.

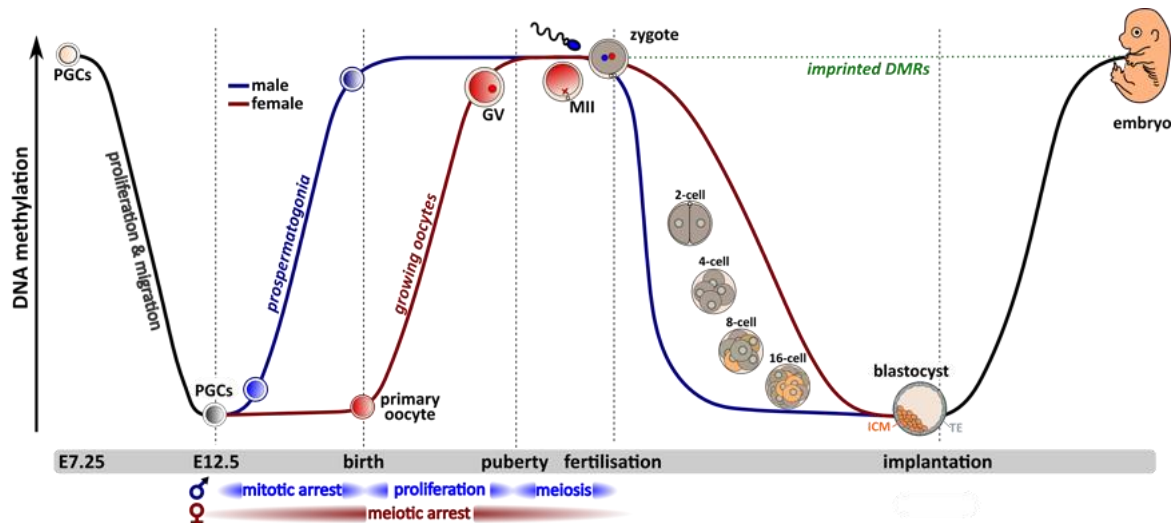


Figure Evolution de la méthylation au cours du développement. Une 1ère vague de déméthylation a lieu dans les PGCs (ligne noire). Par la suite, un nouveau profil de méthylation se met en place sur les futurs gamètes en fonction de leur origine parentale. Suite à la fécondation, on observe une déméthylation active du génome paternel (ligne bleue) et une déméthylation plus lente du génome maternel (ligne marron). Les gènes soumis à l’empreinte parentale ne sont pas touchés par cette déméthylation (ligne verte). Au stade blastocyste, il y a une mise en place d’un nouveau profil de méthylation (ligne noire). D’après Smallwood 2012.

La méthylation de novo a lieu dans des contextes cellulaires différents au sein de la lignée germinale male et femelle. Ceci est très important d’un point de vue mécanistique.

En effet, pour les embryons males, la méthylation de l’ADN est initiée au stade prospermatogonie arrêté en phase G1 de la mitose. Cette méthylation sera complète après la naissance.

Chez les embryons femelles, dans la lignée germinale femelle, la méthylation de l’ADN *de novo* est initiée d’une manière asynchrone pendant la phase de croissance des ovocytes. Les ovocytes en croissance sont au stade diplotène de la prophase I de la méiose.

Les empreintes de méthylation maternelle ne deviennent complètement établies qu’au stade ovocyte mature (Lucifero 2004).

Il y a donc une différence temporelle dans la mise en place des marques de méthylation entre gamètes mâle et femelle : chez le mâle, les marques sont déposées au cours de l’embryogénèse alors que chez la femelle, elles le sont tout au long de la vie adulte.

Autres modifications épigénétiques

Les histones

Les histones présentent de nombreuses modifications post-traductionnelles qui apposent une information épigénétique. Ces modifications constituent le « code histone » modifiant l'affinité des histones à l'ADN et conduisant à des changements de conformation de la chromatine favorisant ou non l'accès des facteurs de transcription et donc l'expression des gènes. (Borrelli 2008) L'**acétylation des histones** correspond au transfert d'un groupe acétyl de l'acétyl-CoA vers un groupement amine d'une lysine située dans la queue N-terminale de l'histone. Ceci entraîne le relâchement de l'interaction histone-ADN conduisant à une plus grande flexibilité de la chromatine et à une accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. Les principaux sites d'acétylation sont les lysines 9, 14, 18 et 23 de l'histone H3 et les lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 (Strahl 2000). La **méthylation des histones** est rendue possible grâce à des histones méthyltransférases (HMT) transférant un groupement méthyl à partir de la S-adénosine-méthionine, ajouté sur des résidus arginine, ou lysine (Bannister 2005, Martin 2005). Elle va modifier l'architecture de la chromatine, et participe à de nombreux processus comme la formation d'hétérochromatine, la réparation et la transcription de l'ADN.

La **phosphorylation des histones** touche principalement la sérine 10 de l'histone H3. Phosphorylée, elle joue un rôle dans la condensation des chromosomes au moment de leur ségrégation durant la mitose et la méiose, l'activation de la transcription et le processus de réparation de l'ADN.



Figure : (A) Structure du nucléosome et (B) principales modifications des queues d'histones. D'après Hamon 2008.

Les ARN non codants

Les différents ARNnc jouent un rôle dans la traduction, la maturation de leurs homologues codants, mais aussi dans l'épissage des ARNm et dans la maturation des ARNr. Les petits ARNs sont impliqués dans la dégradation des ARNm et dans la régulation traductionnelle.

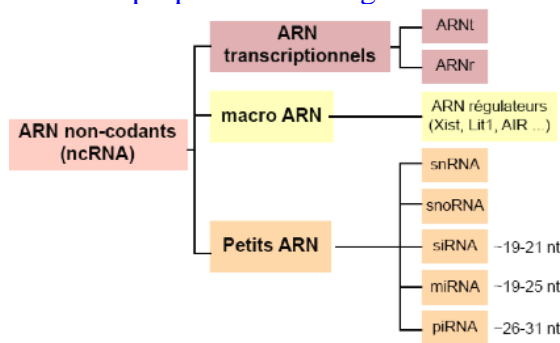


Figure : Les ARN non codants sont un regroupement de plusieurs classes d'ARN en fonction de leur taille, de leur fonction. Les petits ARNs comme les small nuclear RNA (snRNA), les small nucleolar RNA (snoRNA) sont indispensables à la maturation des ARN. Les ARN interférents (siRNA) régulent l'expression génique au niveau post transcriptionnelle. Les micro ARN ou miRNA jouent un rôle au niveau traductionnel. Les macros ARN eux sont impliqués dans l'inactivation du X.

Coopération entre les modifications épigénétiques

Il a été clairement démontré l'existence d'une coopération, d'une "discussion" entre les 2 grandes marques épigénétiques que sont les modifications d'histones et la méthylation de l'ADN. Cette coopération permet d'obtenir un état chromatinien plus ou moins compact et transcriptionnellement inactif ou actif (Khotasanizadeh 2004).

Des travaux suggèrent que les modifications d'histones seraient une condition indispensable à la méthylation de l'ADN. En effet, la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 serait un signal nécessaire pour la méthylation de l'ADN (Fuks 2003, Tamaru 2001, Jackson 2002). L'ADN méthyltransférase (DNMT3L) se fixerait sur la queue de l'histone H3 et recruterait DNMT3a et 3b pour méthyler l'ADN (Ooi 2007). Par la suite, la méthylation de l'ADN exercerait un rétrocontrôle positif sur la méthylation de H3K9, via la fixation sur l'ADN de la protéine MeCP2 qui recruterait des H3K9 méthyltransférases favorisant ainsi la formation d'hétérochromatine (Fuks 2003, Fuks 2005).

D'autres études placent la méthylation de l'ADN comme premier événement de la répression transcriptionnelle. Les protéines de liaison à l'ADN méthylé joueraient un rôle important dans l'initiation des modifications d'histones. Il a notamment été montré que la protéine MeCP2 interagissait avec des HDAC et qu'elle pourrait également intervenir dans la méthylation des histones pour réprimer la transcription (Fuks 2003, 2005).

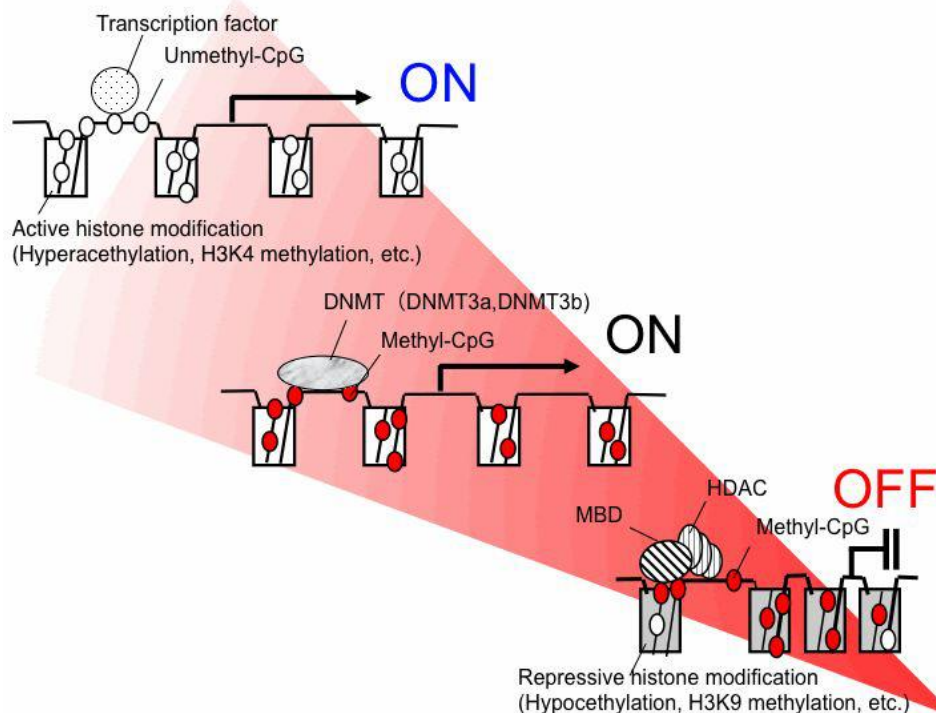


Figure : Coopération entre les différentes modifications épigénétiques dans l'expression des gènes. La méthylation de l'ADN, l'acétylation et la méthylation des histones... agissent ensemble pour induire ou réprimer la transcription via le recrutement des DNMTs, de protéines MBD et des histones deacétylases (HDAC) D'après Kubota 2013.

Ces données montrent l'existence d'un dialogue entre les marques. Il est clairement envisagé que ces interactions ne se fassent pas que dans un seul sens mais dialoguent afin d'obtenir une régulation fine de la structure de la chromatine (Fuks 2005).

L'empreinte génomique parentale

L'empreinte génomique parentale chez les mammifères a été mise en évidence dans les années 80 grâce à des manipulations sur des embryons de souris (Surani 1983, 1984, McGrath 1983, 1984). Cette empreinte, apposée durant la gamétogénèse, régule de façon stricte l'expression de certains gènes de façon différente selon leur origine parentale. Ainsi, les génomes paternel et maternel ne sont pas exprimés de la même façon, ce qui rend la présence de chacun d'eux indispensable au développement de l'embryon.

Définition : C'est un mécanisme physiologique de régulation de l'expression de certains gènes qui conduit à l'inactivation de l'un des 2 allèles parentaux de manière spécifique entraînant donc une expression monoallélique.

Caractéristiques de l'empreinte parentale :

L'empreinte parentale ne touche qu'un petit nombre de gènes, parfois seulement sur certains tissus et/ou à certains stades du développement. L'expression des gènes soumis à l'empreinte est contrôlée par des régions de contrôle de l'empreinte ou ICR (Imprinting Control Region) et est étroitement associée à la méthylation de l'ADN au niveau de régions différenciellement méthylées ou **DMR** (*Differentially Methylated Regions*) (Bartolomei 1993, Ferguson-Smith 1993). La méthylation de l'ADN s'accompagne aussi de changements de la structure de la chromatine par des modifications post traductionnelles des histones, ce qui influence la fixation d'éléments répresseurs. Ces GSE (environ 80 gènes connus à ce jour) sont regroupés en grandes régions chromosomiques (*clusters*) riches en doublets CpG (Paulsen 2000). Les 1^{ers} gènes soumis à l'empreinte parentale identifiés ont été *Igf2*, *Igf2R* et *H19* (DeChiara 1991, Barlow 1991).

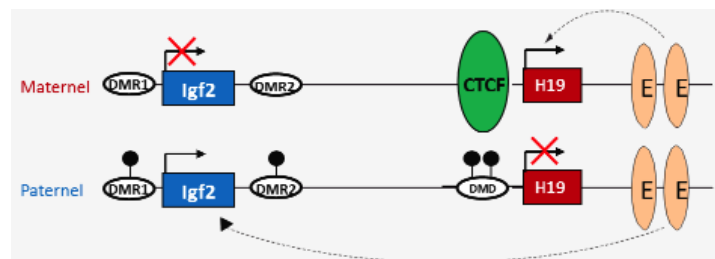


Figure : Organisation et régulation du locus *Igf2/H19*. *Igf2* est exprimé à partir de l'allèle paternel alors que *H19* est exprimé à partir de l'allèle maternel. Ceci est possible grâce à la méthylation des DMRs et au rôle des enhancer (E). CTCF : CCCTC-binding protein.

A quoi sert l'empreinte parentale ?

L'existence de ce phénomène rend « obligatoire » la reproduction sexuée puisque les deux génomes parentaux sont indispensables au développement. Ce serait donc un moyen de favoriser la diversité génétique. D'autre part, les GSE sont connus pour jouer un rôle essentiel durant le développement embryonnaire et fœtal et la croissance post natale précoce. Globalement, les gènes à expression paternelle stimulent la croissance fœtale, alors que les gènes à expression maternelle la restreignent. De ce constat est née la théorie du conflit parental (Moore 1991) selon laquelle les intérêts du père et de la mère divergeraient en particulier en ce qui concerne l'allocation des ressources maternelles au fœtus.

Réseau de gènes soumis à l’empreinte parentale

Des analyses de microarrays ont permis de mettre en évidence l’existence d’un réseau de gènes soumis à l’empreinte impliqués dans le contrôle de la croissance embryonnaire et foetale. Les gènes de ce réseau seraient co-régulés au cours du développement. L’existence de ce réseau de gènes co-exprimés a été observée lors des expériences de perte et de gain de fonction de *Zac1*, un membre clef de ce réseau (Varrault 2006). Cette étude a montré que *Zac1* était très souvent associé à d’autres GSE (*H19*, *Gtl2*, *Igf2*, *Grb10*...) et que son expression affectait le niveau d’expression d’un certain nombre d’autres GSE comme *Dlk1*, *Gnas XL*, *Grb10* ou encore *Mest*. Son knock-out (KO) a montré qu’il régulait également l’expression d’*Igf2/H19* par sa fixation sur les enhancers qui se trouvent en 3’ d’*H19*.

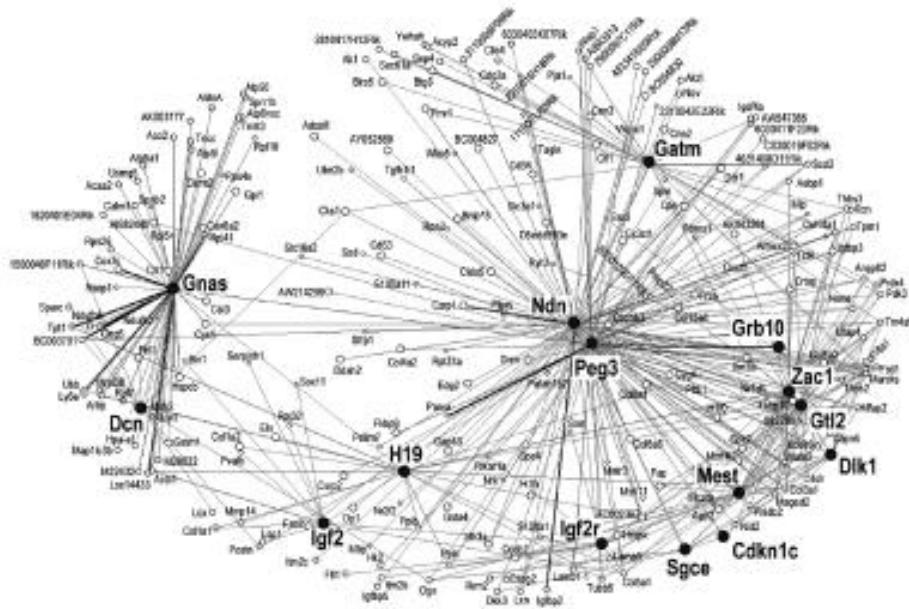


Figure : Représentation virtuelle du réseau de gènes soumis à l’empreinte et leur interaction

Une étude récente a suggéré que certains de ces GSE (11 au total), comme *Igf2*, *H19*, *Zac1*, *Mest*, *Peg*, *Dlk1*, *Gtl2*, *Grb10*, *Ndn*, *Cdkn1c* et *SLC38a4* étaient importants pour la croissance foetale et post natale et que leur diminution d’expression contribuait au ralentissement de la croissance afin de limiter la taille de l’organisme (Lui 2008). Cette étude a renforcé cette notion de co-régulation des GSE car leur expression décroît de manière coordonnée et concomitante avec la décélération de croissance post-natale de plusieurs organes (Lui 2008).

OBJECTIFS ET MODÈLE D'ÉTUDE

Objectifs

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la communauté scientifique via des études épidémiologiques mais aussi via de nombreux travaux sur des modèles animaux a mis en évidence le fait que l'environnement périnatal et notamment l'alimentation maternelle influençait le développement fœtal mais prédisposait et déterminait aussi la susceptibilité à développer des maladies à l'âge adulte. On parle alors d'empreinte nutritionnelle.

L'existence d'un lien étroit entre la dénutrition protéique précoce qu'elle soit fœtale et/ou pendant l'allaitement, et le risque de survenue d'obésité, de pathologies cardiovasculaires ou de maladies métaboliques comme le diabète de type 2 (Hales 2001) a été largement montré. Le modèle de dénutrition protéique pendant la gestation est l'un des modèles les mieux caractérisés au niveau des conséquences physiologiques et métaboliques. Nous avons donc fait varier les teneurs en protéines des régimes maternels car une carence en protéines est connue pour être responsable de l'établissement d'une empreinte nutritionnelle délétère ainsi que de perturbations de la croissance fœtale.

Malgré tout, très peu de choses sont connues au niveau moléculaire, il semble donc primordial d'identifier les mécanismes moléculaires engagés dans cette physiopathologie. Des études préliminaires mettent en avant l'impact de mécanismes épigénétiques comme étant en partie responsables de ce lien. En effet, il est avancé qu'un environnement nutritionnel défavorable pendant la période péri conceptuelle apposerait une marque sur le génome prédisposant à la survenue de pathologies à l'âge adulte. L'un des mécanismes épigénétiques les plus étudiés ces dernières années est la méthylation de l'ADN. Des investigations menées dans le foie ont montré que la dénutrition maternelle et en particulier la restriction protéique pendant la période périnatale modifie le niveau de méthylation du génome entier ou de régions d'ADN correspondantes à des promoteurs de gènes spécifiques. Ces résultats ont conforté l'hypothèse d'une implication des modifications épigénétiques comme un mécanisme moléculaire majeur de la programmation nutritionnelle.

De nombreux apports nutritionnels sont connus pour jouer un rôle dans le développement fœtal. L'acide folique ou les composés de la voie des folates ont été largement étudiés pour leurs effets bénéfiques bien connus sur la prévention des malformations fœtales comme le défaut de fermeture du tube neural. De nombreux travaux sur des modèles animaux ont mis en évidence leur impact sur la mise en place et la régulation de mécanismes épigénétiques. Il

semble donc nécessaire de mieux connaître les mécanismes moléculaires par lesquels ces composés peuvent influencer l’empreinte nutritionnelle. Ce d’autant qu’il ne faut pas oublier que ces composés sont largement prescrits en préventif chez les femmes voulant avoir un enfant. Au-delà de cette supplémentation à visée médicale, notre société commence également et de manière active à prendre des compléments alimentaires sans contrôle médical étroit, ce qui incite à vérifier l’innocuité de ces supplémentations.

Le postulat de départ de cette thèse était que la supplémentation maternelle en composés de la voie des folates que l’on connaît pour être des donneurs de méthyl et donc impliqués dans la méthylation de l’ADN avait un impact sur la mise en place de l’empreinte nutritionnelle apposée par une dénutrition maternelle périnatale.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient :

- 1- D’étudier l’influence des composés de la voie des folates dans l’alimentation maternelle sur la croissance fœtale, le métabolisme énergétique et l’établissement d’une empreinte nutritionnelle
- 2- D’identifier des gènes ou des régions du génome dont l’expression serait sensible aux variations nutritionnelles
- 3- De mettre en évidence des variations de la méthylation de l’ADN en réponse au régime alimentaire maternel

Modèle d’étude

Afin de remplir ces objectifs nous avons développé un modèle animal permettant de tester l’effet d’une supplémentation maternelle en différents composés du cycle des folates (vit B9, Vit B12, zinc, choline, méthionine et bêtaïne). Il est important de préciser que les doses sont relativement élevées mais connues pour être non toxiques. Cette supplémentation a été testée en association avec un régime alimentaire à teneur normale en protéines (20%) ou avec un régime restreint en protéines (8%), connu pour induire un retard de croissance intra-utérin et une programmation métabolique chez le fœtus.

Dans les régimes non supplémentés, les taux de vitamines B6, B12, de choline et de zinc correspondent aux teneurs minimales recommandées pour répondre aux besoins d'un rat de laboratoire en période de gestation et lactation (Reeves 1993, 1997) et il y a une absence totale de bétaine dans les régimes non supplémentés. Les quantités choisies dans les régimes supplémentés ont été définies en accord avec des études publiées dans la littérature (Waterland 2008, 2006, 2009). En effet, des teneurs identiques ont été utilisées chez la souris Agouti pour induire une méthylation différentielle du transposon régulant spécifiquement l'expression ectopique du gène Agouti (Waterland 2008, 2006) sans observer d'effet toxique ou délétère.

Le choix de supplémenter en plusieurs composés a été fait afin d'induire des variations importantes du taux de groupements méthyl disponibles pour les réactions de méthylation de l'ADN en exacerbant le fonctionnement du cycle des donneurs de méthyl dans le but d'augmenter l'efficacité de chacune des étapes du cycle.

Nous avons donc élaboré 4 régimes distincts : un **régime contrôle à 20%** de protéines et **non supplémenté** en donneurs de méthyl, un **régime à 20%** de protéines **supplémenté** en donneurs de méthyl et **2 régimes à 8%** de protéines, **supplémentés ou non** en donneurs de méthyl (Tableau 7). Ces régimes ont été donnés aux mères 15 jours avant l'accouplement et durant toute la période de gestation et de lactation. Les ratons ont ensuite été placés sous régime de croissance et d'entretien avant la mise en place d'un régime de type « Western diet » correspondant à un challenge nutritionnel (Figure 12).

Tableau 7: Composition de nos régimes alimentaires

	Control (C)	Control Supplemented (Csup)	Restricted (R)	Restricted Supplemented (Rsup)
Dextrose (%)	10	10	10	10
Sucrose (%)	10	10	10	10
Soybean oil (%)	4.3	4.3	4.3	4.3
Cellulose (%)	5	5	5	5
Corn starch (%)	43.6	37.8	56.6	50.3
Casein (%)	22	22	9	9
Methionine(g/kg)	7.2	12	2.9	12
Choline (g/kg)	1	15	1	15
Betaine (g/kg)	0	15	0	15
Vit B12 (mg/kg)	25	1000	25	1000
Folic acid (mg/kg)	2	15	2	15
Zinc (mg/kg)	30	180	30	180
Energy (kcal/kg)	3260.8	3064.6	3261.6	3051.4

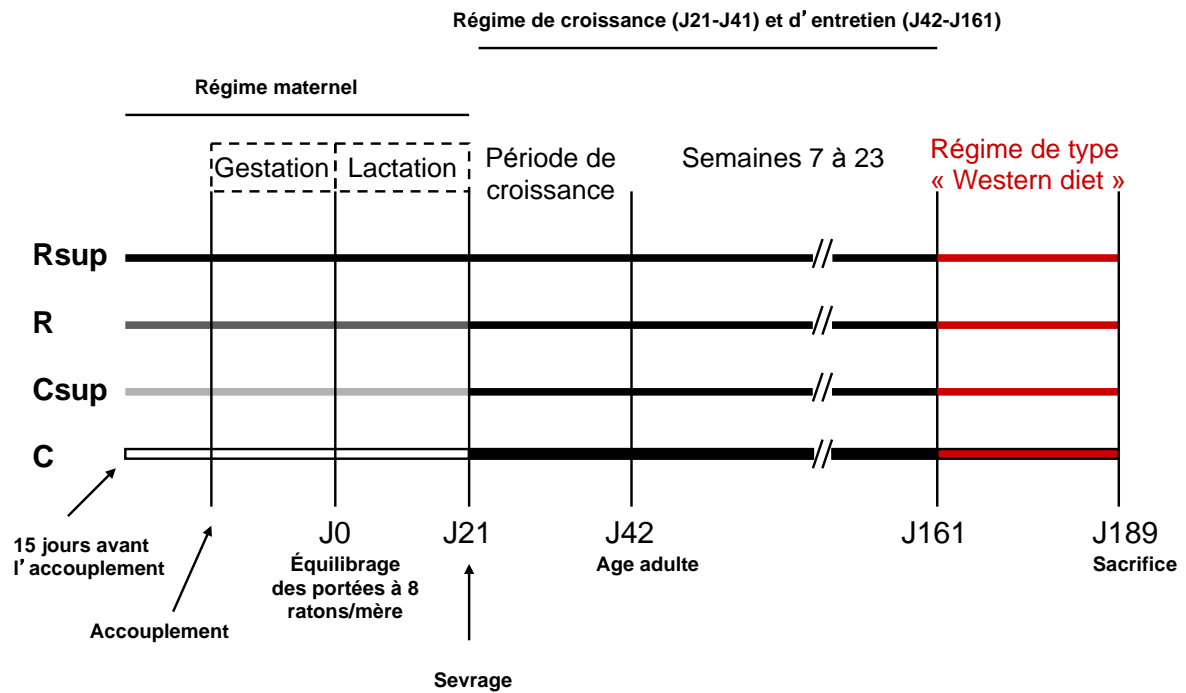


Figure 12 : Schéma du modèle expérimental.

RÉSULTATS

Article 1

Excess of methyl donor in the perinatal period reduces postnatal leptin secretion in rat and interacts with the effect of protein content in diet.

Giudicelli F, Brabant AL, Grit I, Parnet P, Amarger V.

PLoS One. 2013 Jul 1;8(7):e68268.

La programmation nutritionnelle est étroitement liée à l'apparition d'un syndrome métabolique à l'âge adulte. Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'apparition de ces désordres sont encore très peu connus. La méthylation de l'ADN serait un des mécanismes épigénétiques impliqués dans cette programmation.

Les composés du cycle des folates fournissent les groupements méthyl nécessaires aux réactions de méthylation et une prise optimale pendant la gestation est impérative pour le développement fœtal et pour la programmation métabolique à long terme.

L'objectif de cette étude a été d'étudier les effets d'une interaction entre la restriction protéique et la supplémentation en donneurs de méthyl pendant la période périconceptuelle via l'alimentation maternelle et d'identifier les conséquences sur la croissance fœtale, post-natale et à long terme et sur différents paramètres métaboliques.

Cette étude a montré un impact de nos régimes alimentaires au sevrage sur 2 hormones clés du métabolisme énergétique que sont l'insuline et la leptine. En effet, les taux d'insuline plasmatique étaient nettement plus faibles dans les groupes restreints en protéines associés au non à la supplémentation en donneurs de méthyl (-70% dans le groupe Rsup). Cette diminution du taux d'insuline plasmatique était associée à une glycémie plus faible que la normale.

La supplémentation maternelle en donneurs de méthyl a entraîné elle une diminution du taux plasmatique de leptine chez les ratons au sevrage (-40 pour le groupe Csup à -70% pour le groupe Rsup). Mais cette supplémentation n'a pas entraîné de changement significatif d'expression du gène de la leptine pouvant expliquer ces variations plasmatiques. L'analyse par pyroséquencage, correspondant à un séquençage direct permettant d'obtenir un profil de

méthylation pour tous les doublets CG d'une région donnée, a révélé une grande hétérogénéité entre les sites CpG. Globalement les profils de méthylation se révélaient identiques entre nos 4 groupes malgré une tendance à l'augmentation de niveau de méthylation dans les groupes supplémentés en donneurs de méthyl. Pour 4 CpG, les différences du profil de méthylation se sont révélées significatives entre le groupe C et Csup.

De plus, la supplémentation en DM était associée à un poids de naissance plus faible (-12% chez les mâles et -11% chez les femelles). La restriction protéique (groupe R et Rsup) a dramatiquement affecté le poids au sevrage (respectivement -45% et -21%). Sur le long terme, les différences de poids observés chez les femelles ont disparu alors que chez les mâles, le groupe Rsup a pris significativement moins de poids pour une consommation alimentaire identique aux autres groupes (-17%).

Pour conclure, cette étude a montré pour la 1^{ère} fois un impact de la supplémentation maternelle en donneurs de méthyl sur les taux plasmatiques de leptine. Cet effet est majoré lorsque la supplémentation est associée à la restriction protéique maternelle. Un effet modéré de la supplémentation a été observé sur le niveau de méthylation du promoteur de la leptine ne permettant pas à lui seul d'expliquer les fortes variations plasmatiques.

Article 2

Excess of methyl donors in maternal diet affects postnatal down regulation of *Igf2* and *H19* in liver

Fanny Giudicelli, Anthony Pagniez, Patricia Parnet and Valérie Amarger

En préparation

La nutrition maternelle est un facteur environnemental majeur pouvant altérer le génome foetal et pouvant avoir des conséquences sur le long terme avec l'apparition de pathologies métaboliques ou cardio-vasculaires par exemple. Même si peu de données sur les mécanismes engagés sont connues, des observations récentes suggèrent que les conséquences d'une restriction protéique maternelle seraient dues à une régulation épigénétique. Un challenge nutritionnel peut affecter la méthylation de l'ADN en modifiant la disponibilité en groupements méthyls nécessaires à cette réaction.

L'objectif de cette étude a été d'étudier les effets d'une interaction entre la restriction protéique et la supplémentation en donneurs de méthyl sur l'expression des gènes soumis à l'empreinte parentale impliqués et leur régulation par la méthylation de l'ADN.

Cette approche a permis de montrer que certains gènes soumis à l'empreinte parentale impliqués dans la croissance fœtale et appartenant à un réseau avaient une diminution coordonnée et concomitante de leur expression après la naissance. Cette diminution d'expression entre la naissance et le sevrage n'a pas été affectée par nos régimes alimentaires pour la grande majorité des gènes soumis à l'empreinte parentale qui ont été analysés. Pour le gène *Igf2r*, de façon étonnante, alors que l'expression était similaire entre J0 et J21 pour le groupe contrôle, elle était au contraire plus faible à J21 qu'à J0 dans les trois autres groupes, ceci étant probablement lié au fait que le gène était effectivement surexprimé à J0 dans ces 3 groupes.

La nutrition maternelle et particulièrement la supplémentation en donneurs de méthyl a affecté cette diminution d'expression post-natale pour les gènes *Igf2*, *H19*. En effet, *Igf2* et *H19* étaient exprimés de manière plus importante dans les groupes supplémentés. La restriction protéique a également affecté cette expression post-natale mais de manière moins importante que la supplémentation en donneurs de méthyl pour *Igf2*.

Cette étude a également montré que tous les promoteurs d'*Igf2* étaient affectés de la même manière par les régimes alimentaires au sevrage.

L'analyse par pyroséquençage des DMRs (Differentially Methylated Regions) d'*Igf2* n'a pas montré de variation du profil de méthylation. L'analyse de l'ICR d'*H19* n'a pas montré de différence significative sauf pour un CpG pour lequel le taux de méthylation est plus important dans les groupes C et Csup.

L'analyse de la méthylation de ces régions régulatrices n'a pas permis de montrer un lien avec l'expression de ces deux gènes soumis à l'empreinte parentale. Ceci suggère que les profils de méthylation de ces gènes sont résistants à la supplémentation maternelle en donneurs de méthyl ou que la période, la durée de la supplémentation en donneurs de méthyl n'est pas optimum pour avoir un effet sur les marques épigénétiques régulant ces gènes.

Expérience complémentaire : MedIP sequencing

L'étude de la méthylation par pyroséquencage ne permet pas d'avoir une vision globale de la méthylation.

Une étude globale sans à priori via MedIP (Methylated DNA Immuno Precipitation) sequencing (Illumina) nous a donc semblé être une excellente opportunité pour voir à plus grande échelle les effets de la programmation nutritionnelle sur la méthylation du génome. L'utilisation d'un régime alimentaire maternel comportant des concentrations variables de DM comme nous l'avons fait a en effet déjà démontré qu'il pouvait avoir des effets sur la méthylation globale du génome (Cooney 2002, Dolinoy 2006, Rees 2000, Waterland 2008, Wolff 1998).

Le MedIP sequencing consiste en un enrichissement en séquences méthylées via une immunoprécipitation avec un anticorps anti-5-méthylcytosine (5mC) suivi d'un séquençage haut débit.

Ce séquençage haut débit des fragments d'ADN immuno-précipités génère un très grand nombre de séquences lues. Ces séquences sont ensuite alignées sur le génome de référence du rat. L'analyse des données est en cours et devrait permettre de mettre en évidence des régions du génome présentant un taux d'immuno-précipitation variable selon les groupes, signe d'un niveau de méthylation différent.

Cette approche a pour objectif d'identifier si la méthylation globale est influencée par la RP et/ou par la supplémentation en donneurs de méthyl. Elle nous permettra également d'identifier des régions précises du génome sensibles à la nutrition et elle pourra ouvrir la voie à d'autres analyses comme par exemple des études de profil d'expression ainsi que l'identification de grandes fonctions dans lesquelles sont impliqués ces gènes.

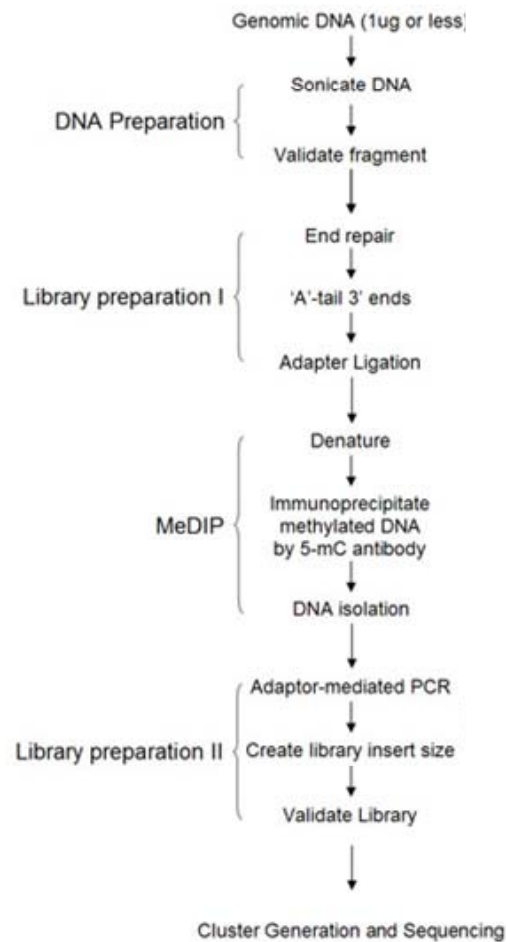


Figure 12: Vue globale du déroulement du MedIP-sequencing

Matériels et méthodes

Animaux

L'expérimentation animale et la composition des régimes ont été présentées dans l'article 1.

L'analyse par MeDIP seq a été réalisée à partir de l'ADN génomique de foie de 24 animaux âgés de 21 jours (6 animaux par groupe)

Extraction ADN

Une extraction d'ADN a été réalisée avec le kit DNeasy Blood and Tissue, Qiagen en suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, environ 20mg de foie ont été incubés pendant 4-5h à 56°C en présence de protéinase K suivi d'un traitement à la RNase A (100mg/ml). Le lysat a ensuite été passé sur colonne et élué avec le tampon recommandé.

Les ADN ont été dosés par la technique du Quant-iT™ PicoGreen®, Invitrogen.

Préparation de la librairie et MeDIP (Figure 12)

6µg d'ADN ont été fragmentés par sonication pendant 9 cycles (30 sec ON/30 sec OFF) en position HIGH dans un sonicateur Bioruptor, Diagenode. La fragmentation a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% afin de vérifier que la majorité des fragments avait une taille d'environ 500pb. L'ADN a ensuite été purifié grâce aux billes AMPure XP Beads, Agencourt.

La préparation de la librairie a été réalisée grâce au kit Next DNA LibraryPrep Master mix set for Illumina (New England Biolabs), suivant les recommandations du fournisseur comportant les étapes de End Repair, dA-Tailing et de Quick ligation. Toutes ces étapes ont été suivies d'une purification par billes AMPure XP Beads. Les ADN ont été dosés au Quant-iT™ PicoGreen®, Invitrogen afin de débiter l'immunoprécipitation avec les mêmes quantités d'ADN pour tous les échantillons.

2µg d'ADN ont été utilisés pour la réaction d'immuno-précipitation. L'ADN a été dénaturé pendant 10min à 95°C puis immuno-précipité sur la nuit à 4°C avec 1µl d'anticorps anti 5mC (BI-MECY-500, Eurogenetec) par µg d'ADN. Le mélange ADN-Anticorps a été incubé avec 40µl de billes Dynabeads, Invitrogen pendant 2h à 4°C puis lavées 3 fois avec 700µl de tampon IP (100 mM Na-Phosphate pH 7.0, 1.4 M NaCl, 0.5 % Triton X-100) puis l'anticorps a été éliminé par un traitement à la protéinase K pendant 3h à 50°C. Une extraction phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol ont été réalisées. Une qPCR de contrôle du MeDIP a été faite sur le LighCycler, Roche avec des primers spécifiques d'ADN méthylé (TSH2B) et d'ADN non méthylé (GAPDH), Diagenode. Les cycles de PCR sont : 95°C 10min, 45*(95°C 15s, 60°C 30s, 72°C 15s).

L'ADN immunoprécipité a été amplifié par PCR d'enrichissement basée sur l'utilisation des adaptateurs suivant les recommandations du fournisseur. Les cycles de PCR sont : 94°C 30s, 16*(94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s), 72°C 1 min. Les produits PCR ont été purifiés par billes AMPure XP Beads. Un contrôle qualité a été réalisé par Bioanalyser kit High Sensitivity DNA, Agilent 2100.

Une migration sur gel d'agarose a été faite afin de sélectionner des fragments d'ADN autour de 400-500bp. La portion de gel contenant les fragments de taille voulue a été excisée du gel

et l'ADN purifié à l'aide du kit MinElute gel Extraction kit (Qiagen). Un contrôle qualité a été réalisé par Bioanalyser kit High Sensitivity DNA, Agilent 2100.

Une quantification finale a été réalisée par PCR avec le Kit KAPA Library Quantification, Clinisciences. Les cycles de PCR sont : 95°C 5min, 45*(95°C 30s, 60°C 45s, 72°C 20s).

Séquençage

Les 24 librairies correspondant aux 24 échantillons ont été poolées et déposées en 8 exemplaires dans 8 lignes différentes d'une « Flow cell » du séquenceur.

Une dénaturation au NaOH a été faite et une solution finale à 10pM avec 10% de Phix (Librairie contrôle de séquençage) a été utilisée pour le séquençage grâce à l'appareil Genome Analyzer High-Seq 1000, Illumina et une lecture « paired-end » de 2x75bp a été faite.

L'une des limites de cette technique est le fait que l'immuno-précipitation ne peut être efficace que s'il y a une densité suffisante de sites méthylés sur un même fragment d'ADN. Ainsi, une région contenant peu de sites méthylés sera moins représentée dans la fraction immuno-précipitée qu'une région plus dense en sites même si ceux-ci sont moins méthylés. L'enrichissement en une région donnée dépend donc à la fois du niveau de méthylation de cette région mais aussi du nombre de sites potentiels de méthylation de la région.

Les analyses du grand nombre de données générées par ce genre d'approche sont actuellement en cours avec l'aide d'un bio informaticien.

DISCUSSION

Le premier objectif de notre étude a été d'étudier les effets d'une interaction entre la restriction protéique et la supplémentation en donneurs de méthyl pendant la période périconceptuelle via l'alimentation maternelle et d'identifier les conséquences sur la croissance fœtale, post-natale et à long terme, sur différents paramètres métaboliques. Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés à l'expression des gènes soumis à l'empreinte parentale impliqués dans la croissance fœtale et post-natale et leur régulation par la méthylation de l'ADN, notre objectif étant de façon plus générale d'étudier les conséquences de l'alimentation maternelle sur les variations du méthylome.

Dans la première publication (Article 1, Giudicelli et al, PlosOne 2013) nous montrons que la supplémentation maternelle en donneurs de méthyl, quelle soit associée ou non à la restriction protéique entraîne une diminution du taux plasmatique de leptine chez les rats au sevrage et des évolutions de croissance pondérale différentes. De plus, l'analyse par pyroséquençage a révélé un taux de méthylation du promoteur de la leptine plus fort dans les groupes supplémentés en donneurs de méthyl.

Dans la deuxième publication (Article 2, en cours de rédaction) en utilisant le même modèle animal et les mêmes régimes, nous avons présenté les conséquences sur l'expression des gènes soumis à l'empreinte parentale et leur régulation par la méthylation de l'ADN.

Enfin dans un troisième chapitre (Expérience complémentaire) nous avons présenté l'approche utilisée pour étudier l'effet de l'interaction entre la restriction protéique et la supplémentation en donneurs de méthyl sur le méthylome du foie, utilisé comme organe cible parce que fortement impliqué dans le métabolisme énergétique.

Cette discussion va nous permettre de revenir sur le choix du modèle utilisé et de replacer les conséquences des différents régimes fournis aux mères pendant la gestation et la lactation, et des effets observés sur la croissance, le comportement alimentaire et l'adaptation à un régime obésifiant de leurs descendances dans le contexte des connaissances actuelles sur la programmation nutritionnelle. Nous discuterons également du réseau de gènes soumis à l'empreinte parentale et des éléments nouveaux fournis par notre étude sur leur sensibilité aux apports nutritionnels. Enfin nous terminerons sur les perspectives dégagées par les différentes approches expérimentales de l'étude de l'empreinte parentale et nous discuterons également de l'intérêt des suppléments nutritionnelles en clinique humaine.

L'un des 1^{ers} objectifs de ce travail était d'étudier l'influence de la restriction protéique et d'une supplémentation en composés de la voie des folates sur la croissance fœtale et post-natale, sur le métabolisme énergétique et sur l'établissement d'une empreinte nutritionnelle.

Nous avons tout d'abord observé une influence des différents régimes alimentaires sur la consommation des mères pendant l'expérimentation. En effet, les mères nourries avec les régimes supplémentés en donneurs de méthyl et plus particulièrement celles du groupe Csup consommaient des quantités plus faibles de nourriture, surtout pendant la période préconceptionnelle et la gestation. Les raisons de cette observation ne sont pas connues, mais il est possible que les donneurs de méthyl altèrent la saveur de l'aliment ou sa capacité satiétogène bien que ceci n'ait pas été reporté dans la littérature. Cette baisse de consommation a eu pour conséquence une légère différence de poids entre les femelles supplémentées et les autres au début de la gestation. La prise de poids des femelles pendant la gestation était également réduite chez les femelles supplémentées ainsi que, de façon moindre, chez les femelles restreintes en protéines (groupe R). Ainsi, cette prise de poids était affectée d'une part par la restriction protéique mais aussi par la présence des donneurs de méthyl, ces derniers ayant plutôt une action au niveau de la prise alimentaire.

Cette différence de prise de poids des femelles gestantes a bien sûr eu des répercussions sur le poids de naissance des ratons. En effet, les femelles supplémentées ont donné naissance à des ratons de poids inférieur à ceux du groupe contrôle, et cet effet était très marqué pour le groupe Rsup (mâles -12%, femelles -11%, $p < 0.0001$).

Par contre, de façon étonnante, les ratons du groupe R avaient des poids légèrement supérieurs à ceux du groupe contrôle, bien que la prise de poids des mères pendant la gestation ait été plus faible. Ceci contraste avec la plupart des études faisant intervenir une restriction protéique dans le but d'induire un retard de croissance intra-utérin, même s'il est vrai que les conséquences de la restriction protéique sur les poids de naissance sont variables d'une étude à l'autre (Bellinger 2006, Plagemann 2000, Coupé 2009). Une explication possible pourrait être le fait d'avoir soumis les femelles au régime restreint en protéines dès la période préconceptionnelle, alors que, dans la plupart des modèles, c'est seulement à partir du premier jour de gestation que le régime est mis en place. Une initiation précoce pourrait

entraîner un phénomène d'adaptation métabolique qui aurait pour conséquence une allocation préférentielle des ressources aux petits aux dépens de la mère.

Ceci renforce l'hypothèse émise par certains selon laquelle la nutrition et le statut métabolique de la mère avant la gestation seraient des déterminants importants de la croissance fœtale (Langley-Evans 1998).

En conclusion, le poids de naissance semble donc être lié et influencé par une combinaison de plusieurs facteurs dont la prise alimentaire maternelle et la teneur en protéines du régime. L'effet de la supplémentation en donneurs de méthyl est plus difficile à appréhender dans notre cas car il est impossible de le distinguer de la prise alimentaire.

Nous avons pu observer que la croissance des rats durant la lactation était réduite par la supplémentation maternelle en donneurs de méthyl et la restriction protéique. En effet, les animaux du groupe Rsup présentaient une réduction de poids de près de 45% par rapport aux animaux contrôles (Figure 12).

La restriction protéique est connue pour réduire la croissance durant la lactation chez le rat (Coupé 2009, Cherala 2006) mais également chez la souris (Jousse 2011). La supplémentation en donneurs de méthyl est également associée à une réduction de la croissance post-natale mais cet effet pourrait être dû soit à la supplémentation en elle-même soit à la diminution de la prise alimentaire maternelle. Cette même observation de la réduction de la croissance post-natale a également été faite dans un modèle de souris soumis au même niveau de supplémentation (Waterland 2006).

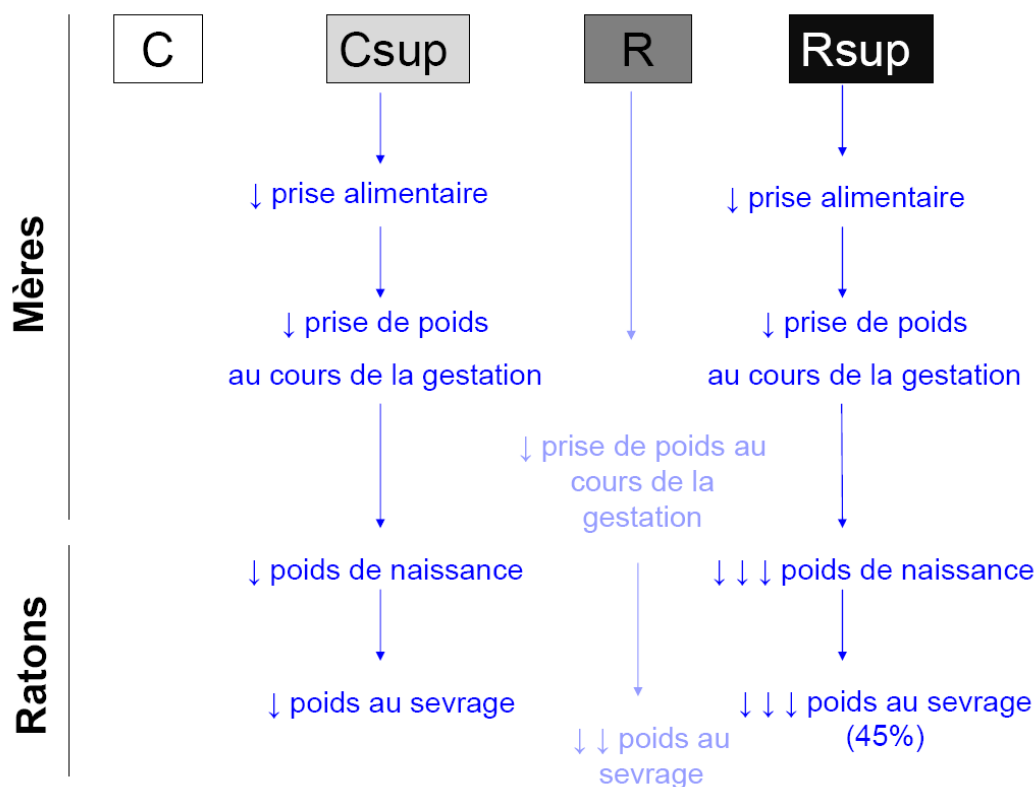


Figure 12 : Bilan de l'effet de nos régimes alimentaires maternels sur la prise de poids des mères et des ratons à la naissance et au sevrage.

Nous avons observé à J21 que les animaux nés de mères restreintes en protéines (groupes R et Rsup) présentaient des taux d'insuline plasmatique très inférieurs à ceux des groupes C et Csup. Cette observation était attendue et est en adéquation avec la littérature. Il est en effet connu que la restriction protéique affecte le développement intra-utérin du pancréas, entraînant un nombre limité de cellules sécrétrices d'insuline (Portha 2011, Garofano 1997, Snoeck 1990).

Un résultat majeur de cette étude est le fait que les animaux nés de mères supplémentées en donneurs de méthyl présentaient à J21 des taux de leptine plasmatique largement inférieurs à ceux des animaux nés de mères non supplémentées. Ces taux n'étaient pas corrélés avec les taux de leptine plasmatique des mères, comme on aurait pu le penser. En effet, il a été suggéré que la leptine des petits pouvait en partie provenir de la leptine maternelle qui serait transmise via le lait maternel (Pico 2007).

Notre projet a donc permis de montrer pour la 1^{ère} fois que la supplémentation maternelle en donneurs de méthyl réduisait largement les taux de leptine plasmatique au sevrage.

La réduction des apports alimentaires ou la RP maternelle ont un impact connu sur la leptine en affectant son taux plasmatique (Jousse 2011, Zambrano 2006) et en réduisant la croissance post-natale (Coupé 2010, Tian 2013).

Dans notre étude, la croissance post-natale a été affectée majoritairement pour les groupes restreints en protéines par rapport au contrôle alors que, à *contrario*, la leptine plasmatique n'a été affectée que dans les groupes supplémentés en donneurs de méthyls associés ou non à la restriction protéique. Ceci montre qu'il n'y a pas de lien entre la croissance et la leptine mais qu'il y a un impact direct de l'alimentation maternelle sur les taux de leptine plasmatique. Nous pouvons dire que dans le groupe contrôle supplémenté en DM, c'est la supplémentation qui a un effet sur la sécrétion de leptine et que lorsque cette supplémentation est couplée à une RP, on a une action synergique des deux sur la sécrétion de leptine.

Dans cette étude, l'objectif primaire n'était pas d'étudier la cinétique de la sécrétion de leptine donc nous n'avons pas fait de mesure à différents stades. Nous ne pouvons donc rien dire sur le pic de leptine néonatale qui a été illustré par différentes publications (Bouret 2004, Coupé 2009, Delahaye 2008). Cependant il a été avancé que la réduction du taux de leptine à J21, comme nous l'avons dans notre étude, serait l'observation d'un défaut de sécrétion de leptine durant la période de lactation (Delahaye 2008). Ces résultats suggèrent que la supplémentation en DM entraîne un taux de leptine inférieur de la naissance au sevrage et que ces taux faibles persistent jusqu'à l'âge adulte pour le groupe Rsup.

Nous avons émis l'hypothèse que l'effet des DM sur la sécrétion de leptine serait dû à un mécanisme épigénétique comme cela a déjà été montré (Davison 2009, Jiang 2012, Tian 2013). En effet, une étude a montré que la réduction du taux de leptine plasmatique due à une RP maternelle était corrélée à une diminution du taux de méthylation des îlots CpG présents au sein du promoteur du gène de la leptine (Jousse 2011). Nous avons fait le choix de nous concentrer sur les potentiels mécanismes épigénétiques engagés dans la programmation nutritionnelle.

L'étude de la méthylation du promoteur de la leptine dans le tissu adipeux a montré un niveau de méthylation plus important dans les groupes supplémentés en DM. Mais cette hyperméthylation reste modérée par rapport aux grandes variations de leptine plasmatique observées. Il en est de même pour l'expression du gène chez les rats à J21. La leptine

plasmatique n'est donc pas complètement corrélée au taux de méthylation et à l'expression du gène (Figure 13). Mais la leptine circulante à un instant donné est susceptible de refléter plutôt la quantité d'adipocytes matures plutôt que l'expression du gène. En effet, le promoteur du gène de la leptine est extrêmement méthylé au sein des pré-adipocytes indifférenciés et se déméthyle durant le processus de différenciation (Melzner 2002) permettant ainsi l'expression du gène. Nous sommes peut-être ici dans un cas de maintien des cellules du tissu adipeux au stade pré-adipocytaire, expliquant ainsi la méthylation du promoteur du gène de la leptine, et une production moindre de leptine par le tissu adipeux chez les animaux nés de mères supplémentées en DM.

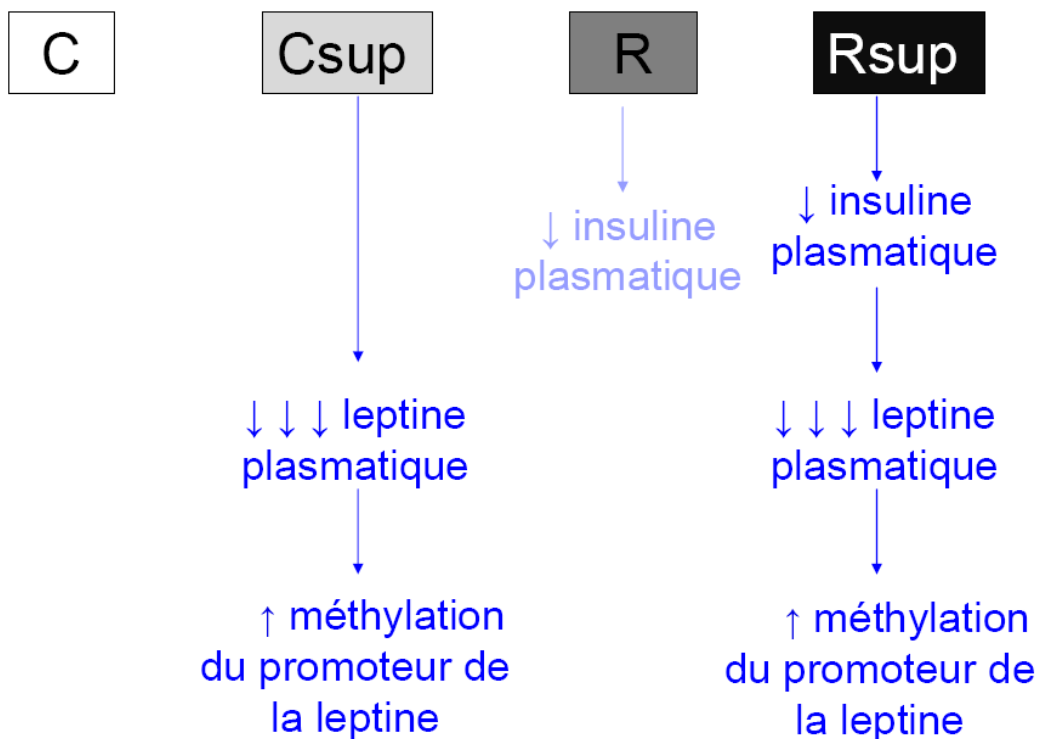


Figure 13 : Bilan de l'effet de nos régimes alimentaires maternels sur l'insuline et la leptine au sevrage, deux hormones clés du métabolisme énergétique, et sur le niveau de méthylation du promoteur du gène de la leptine.

Mais si ce taux de leptine n'est pas corrélé à la différenciation du tissu adipeux des rats, alors d'où vient la leptine?

Actuellement et malgré un nombre très important d'études, les sources de leptine néonatale sont encore en débat aussi bien chez les espèces animales de laboratoire que chez l'Homme. Aucun pic de leptine plasmatique n'a été retrouvé chez l'enfant alors qu'une forte concentration a été retrouvée suite à des prélèvements de plasma issu du cordon ombilical pendant les premières semaines de gestation (Jaquet 1998). Il a été avancé que cette source de leptine serait d'origine maternelle ou placentaire. Le placenta a en effet été identifié comme source de leptine dans plusieurs études chez l'Homme (Linnemann 2000, Sagawa 2002). Mais dans notre étude, il semble difficile d'imaginer que la leptine plasmatique des rats dérive de la sécrétion de leptine placentaire car il est connu que celle-ci passe pour la grande majorité dans la circulation maternelle (Lewandowski 1999) mais très peu dans la circulation fœtale (2%) (Linnemann 2000).

Des études chez le rongeur ont proposé des alternatives comme source de leptine comme l'estomac (Bado 1998), et les glandes mammaires (Smith- Kirwin 1998). Mais il a également été proposé que le lait maternel était la source principale de leptine si on accepte l'idée que la leptine peut passer de l'estomac du petit vers la circulation sanguine (Casabiell 1997, Smith- Kirwin 1998).

Il a été montré chez des mères allaitantes une corrélation positive entre le taux de leptine dans le lait et dans le plasma durant toute la période de lactation (Miralles 2006, Houseknecht 1997).

De plus, il a été publié que le poids des enfants pendant leurs deux premières années de vie pouvait être corrélé négativement à la concentration de leptine dans le lait au début de la période de lactation (Miralles 2006).

Il semble donc primordial, compte tenu de ces données, de privilégier l'allaitement par rapport au lait industriel. La nutrition par le lait maternel pourrait donc protéger de manière modérée les enfants face à une prise de poids excessive (Palou 2009).

Nous avons ensuite voulu tester les conséquences à long terme des différents régimes maternels testés afin de voir un éventuel effet programmeur sur la croissance, la prise de poids et le métabolisme, en particulier en présence d'un challenge nutritionnel hypercalorique. Ainsi, après sevrage, les animaux ont été nourris avec un régime standard jusqu'à l'âge de 150

jours puis avec un régime de type western diet, hypercalorique, riche en graisses et en sucres rapides.

Nous avons tout d'abord rapidement observé une différence entre les mâles et les femelles au niveau de la prise de poids après le sevrage. En effet, alors que les différences de poids observées au sevrage entre les différents groupes ($R_{sup} < R < C_{sup} < C$) se sont rapidement atténuées pour les femelles, elles se sont au contraire maintenues pour les mâles, ceux du groupe R_{sup} prenant significativement moins de poids que ceux du groupe contrôle, avec une situation intermédiaire pour les groupes C_{sup} et R .

Ce dimorphisme sexuel n'est pas surprenant, il a déjà été montré que la RP pendant la gestation et la lactation n'avait pas les mêmes impacts sur les femelles et sur les mâles à long terme (Han 2012). L'exposition à la RP en période périnatale et à un régime hypercalorique à l'âge adulte entraîne chez la souris l'apparition d'une obésité et d'une intolérance au glucose chez les femelles alors que les mâles en sont protégés (Han 2012).

Il a également été mis en évidence que les rats mâles avaient une plus grande susceptibilité à la survenue d'une hypertension à l'âge adulte par rapport aux femelles (Langley-Evans 1996, Maloney 2011) ; ou encore qu'un régime maternel gras entraînait une élévation de la pression sanguine uniquement chez les femelles (Khan 2003).

Ce dimorphisme n'a pas été observé uniquement chez le rongeur, une autre étude menée chez le porc a montré (Gonzalez-Bulnes 2012) que la restriction maternelle entraînait une diminution du poids des mâles au sevrage qui n'est pas retrouvé chez les femelles. Seules les femelles ont en effet montré un rattrapage de croissance neutralisant les effets du retard de croissance prénatal et ainsi présenté un développement similaire au groupe contrôle.

Outre la restriction protéique, une étude a montré que la supplémentation en acide folique affectait la prise de poids de manière plus importante chez les mâles que chez les femelles (Chmurzynska 2012).

Suite à la mise en place du régime cafétéria, nous avons observé dans tous les groupes une augmentation importante de la prise alimentaire au cours de la 1^{ère} semaine. Cependant, tous les animaux ont rapidement régulé leur consommation tout en conservant quand même des apports énergétiques supérieurs d'environ 20% à ceux qu'ils avaient sous régime standard.

Nous n'avons pas observé de différence entre les groupes au niveau de la quantité de nourriture consommée, que ce soit sous régime standard ou sous régime Western. Il semblerait donc que l'environnement nutritionnel maternel n'ait pas eu d'effet sur la

programmation de la prise alimentaire dans notre modèle et sur la capacité des animaux à rééquilibrer leur consommation en cas de régime hypercalorique.

Il avait été montré dans notre laboratoire que la restriction protéique maternelle pendant la gestation et la lactation entraînait une perturbation des rythmes alimentaires sans changement au niveau de la quantité totale ingérée (Coupé 2009, Orozco-Solis 2011).

Nous ne pouvons effectivement pas exclure que les rythmes alimentaires aient été perturbés dans notre modèle.

Un des résultats marquants de notre étude est le fait que les animaux nés de mères supplémentées en donneurs de méthyl présentaient un gain de poids à l'âge adulte moins important que les animaux contrôles ; ceci suggérant un effet à long terme de l'environnement nutritionnel précoce.

Cet effet est d'autant plus marqué pour les animaux du groupe Rsup. Ces animaux ont subi un retard de croissance intra-utérin suivi d'une croissance postnatale faible. Leur rattrapage de croissance a été tardif, voire même incomplet puisqu'ils ont conservé un poids inférieur à l'âge adulte. En présence d'un régime obésifiant ces animaux continuent à prendre moins de poids. Normalement, la plupart des petits poids de naissance présentent un rattrapage de croissance rapide au cours du développement précoce. Il a été montré que ce mécanisme de compensation entraînait une augmentation de la survenue d'une résistance à l'insuline, d'obésité, de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Cianfarani 1999, Eriksson 1999, Ong 2000, Bieswal 2006).

Chez le rongeur, ce rattrapage de croissance réduit également l'espérance de vie (Ozanne 2004).

Le fait d'être exposé à un régime hypercalorique de type Western est un moyen d'exacerber les effets programmateurs d'une restriction nutritionnelle précoce et de révéler les conséquences du « thrifty phenotype » acquis en période pré- et post-natale.

Nous avons pu constater que la supplémentation maternelle en donneurs de méthyl semblait protéger les animaux contre la prise de poids en réponse au régime western. Cependant il faut garder présent à l'esprit que nous avons soumis les animaux à un régime hypercalorique pendant une période limitée (4 semaines), nous ne pouvons donc pas exclure qu'une exposition prolongée aurait pu avoir des conséquences plus marquées (Figure 14).

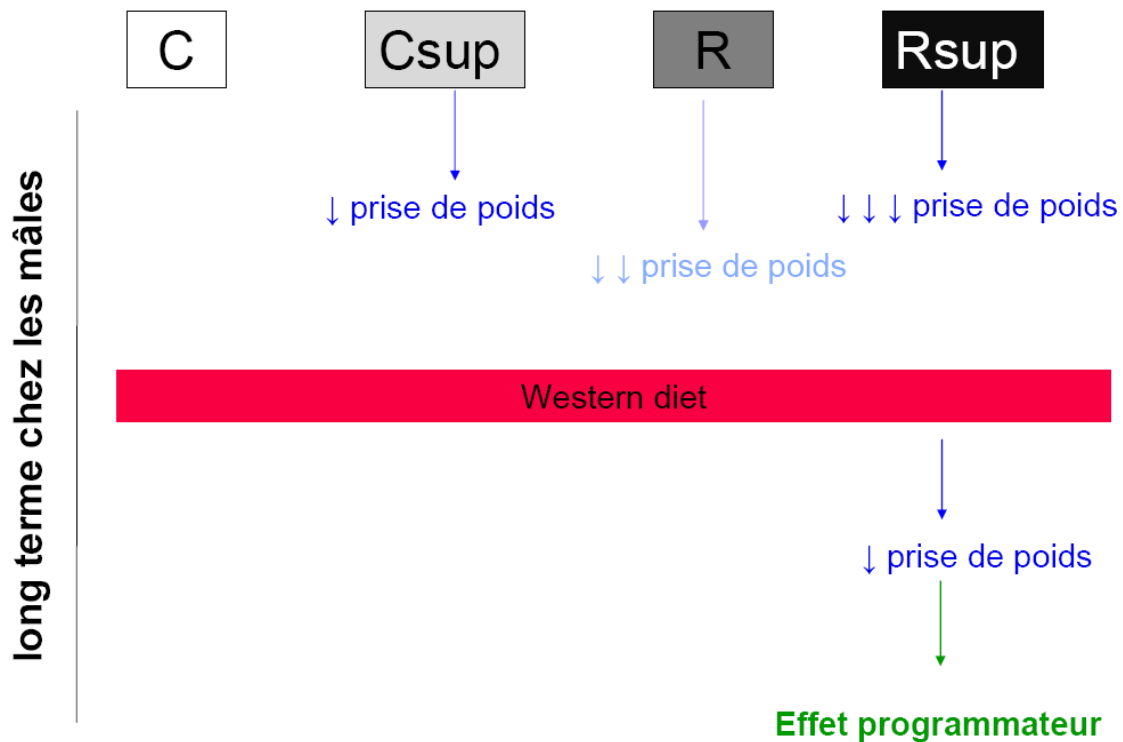


Figure 14 : Bilan de l'effet de nos régimes alimentaires maternels sur la prise de poids des mâles à long terme.

Nous avons donc observé des effets à court et à long terme des régimes maternels sur la croissance et la prise de poids d'une part et sur certains paramètres hormonaux d'autre part. Nous avons ainsi montré que la supplémentation maternelle en donneurs de méthyl avait pour conséquence une diminution très nette des niveaux de leptine plasmatique au moment du sevrage. Il serait intéressant de savoir si ces taux de leptine sont réduits de façon continue pendant toute la période de lactation et en particulier si le pic de leptine qui survient normalement en période postnatale a été affecté.

Nous avons également montré que cette supplémentation maternelle en donneurs de méthyl semblait réduire la prise de poids à l'âge adulte en régime standard mais aussi en régime hypercalorique.

Cependant, si l'on considère que les femelles supplémentées en donneurs de méthyl avaient une prise alimentaire plus faible en période de lactation, nos observations sont alors en accord avec celles faites par Palou et al (2001) qui a montré qu'une restriction calorique modérée pendant la lactation protégeait contre une obésité induite par un régime hyper gras. Cette adaptation passerait par une meilleure sensibilité à l'insuline et à la leptine.

En perspective à ce travail, il serait intéressant de poursuivre notre étude par des analyses portant sur l'influence des DM sur la différenciation des pré-adipocytes pour éventuellement corrélérer cette augmentation du taux de méthylation du promoteur du gène de la leptine avec un ralentissement de la différenciation des cellules du tissu adipeux en adipocyte mature. Pour ce faire nous pourrions envisager de réaliser un marquage du seul marqueur spécifique de la population de pré-adipocyte qu'est le facteur Pref-1. Ce facteur est largement exprimé au stade pré-adipocytaire et son expression diminue au cours de la différenciation (Villena 2002). Nous pourrions également faire des coupes de tissu adipeux et réaliser des observations au microscope afin de quantifier la différenciation des adipocytes en observant l'accumulation de gouttelettes lipidiques qui engendre des modifications morphologiques avec la perte de l'allure fibroblastique du pré-adipocyte et signifiant l'apparition d'un adipocyte mature. Selon les résultats, si le maintien du tissu adipeux au stade pré-adipocytaire n'est pas corrélé à la leptine plasmatique il serait intéressant d'effectuer des dosages de leptine dans le lait maternel.

Nous avons donc pu montrer l'influence des régimes maternels utilisés dans notre étude sur des paramètres hormonaux susceptibles d'avoir un effet programmeur sur le risque de développer des désordres métaboliques à plus ou moins long terme.

Le deuxième objectif était d'identifier des gènes dont la régulation et l'expression seraient modifiées par le régime maternel et qui seraient responsables de cette programmation. Par la suite, nous avons tenté d'élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents en nous attachant plus particulièrement à la méthylation de l'ADN.

Nous avons choisi de compléter les femelles avec un excès de donneurs de méthyl et cofacteurs dans le but de perturber et stimuler le cycle des folates et celui de la méthionine, qui sont intimement liés et influencent la disponibilité en groupements méthyls utilisés pour les différentes réactions de méthylation, dont en particulier celles impliquées dans la régulation épigénétique du génome.

Il était donc important de vérifier si ce cycle était effectivement perturbé. Nous avons pour cela choisi de doser l'homocystéine maternelle, qui est le produit issu de la déméthylation de la méthionine. Nous avons fait le choix de prélever le sang des mères uniquement au moment du sevrage, c'est-à-dire lorsque les rats atteignent l'âge de 21 jours, ceci afin de ne pas infliger de stress aux femelles et à leurs petits pendant les périodes de gestation et lactation. Nous avons observé que les femelles supplémentées en donneurs de méthyl présentaient une hyperhomocystéinémie (Figure 15).

Ce résultat n'était pas attendu car nous pensions qu'en fournissant un excès des composés et cofacteurs principaux du cycle de l'acide folique et de la méthionine, il n'y aurait pas d'étape limitante et donc pas d'accumulation de l'un ou l'autre des composés.

D'autre part, ceci n'avait jamais été mentionné par les auteurs ayant utilisé les mêmes doses de donneurs de méthyl (Waterland 2006, 2008, Wolff 1998), probablement parce qu'ils n'avaient pas fait ce dosage. L'hyperhomocystéinémie survient en général dans les cas de déficience en acide folique du fait de la réduction de la réaction de transméthylation qui reméthyle l'homocystéine en méthionine en utilisant le méthyl-tétra-hydrofolate comme donneur de méthyl.

Il est peu vraisemblable que ce soit la même raison dans notre modèle du fait des quantités non limitantes d'acide folique et de vitamine B12, qui sont des cofacteurs de la réaction de transméthylation.

Il est par contre possible que cette réaction ou celle utilisant la bétaine comme donneur de méthyl aient été inhibées par un excès de méthionine (Finkelstein 1986, Ingenbleek 2011). L'hyperhomocystéinémie peut avoir des conséquences délétères sur la gestation (Nelen 2000), mais nous n'avons rien observé de tel dans notre modèle.

Cependant, nous avons effectivement observé une tendance à la diminution de la fertilité et de la taille des portées pour les mères du groupe Csup. Mais ceci n'a pas été le cas pour le groupe Rsup suggérant potentiellement que l'hyperhomocystéinémie ne serait pas la cause de cet effet.

Il est connu qu'un excès de plusieurs acides aminés ou qu'un déséquilibre du rapport entre la méthionine et les autres acides aminés puissent affecter les fonctions reproductives (Rees 2006, Matsueda 1982). Ceci pourrait être le cas dans notre étude mais nous ne pouvons réellement conclure sur cet effet qui n'était pas très marqué.

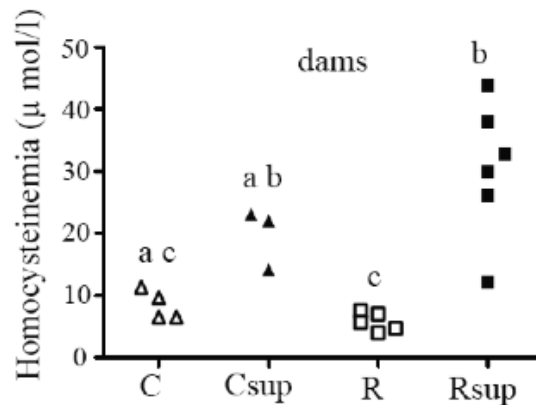


Figure 15: Homocystéine plasmatique chez les mères en fin de lactation

Pour confirmer cette perturbation du cycle des folates, nous aurions pu également doser d'autres composés du cycle comme la SAM par exemple qui est le donneur ultime de groupement méthyl nécessaire pour les réactions de méthylation (Selhub 1999).

Nous avons par la suite cherché à identifier des gènes ou des régions sensibles aux variations nutritionnelles, et, pour ce faire, nous avons fait le choix de nous intéresser à une classe particulière de gènes, ceux soumis à l'empreinte génomique parentale, car ces gènes sont soumis à une régulation très stricte de leur expression placée sous le contrôle de mécanismes épigénétiques permettant une expression monoallélique selon l'origine parentale.

Nous nous sommes intéressés à un groupe de gènes soumis à l'empreinte parentale qui sont exprimés à la fois dans les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Leur expression décroît de manière coordonnée, concomitante et considérable après la naissance avec la décélération de la croissance post-natale (Lui 2008). Mais ils restent tout de même fortement exprimés dans les tissus issus du mésoderme comme le muscle, le cartilage et les os (Charalanbous 2003). Dans notre étude nous avons mis en évidence dans le foie cette diminution d'expression coordonnée et ceci de manière indépendante des différents régimes alimentaires.

Ces gènes soumis à l'empreinte parentale font partie d'un réseau virtuel qui a été construit grâce à des méta-analyses. Un acteur principal de ce réseau a été identifié comme assurant la co-régulation de l'expression de ces gènes soumis à l'empreinte parentale. La perturbation de cet acteur principal constitue une opportunité unique de perturber ce réseau dans sa globalité.

Il s'agit du gène *Zac1* qui code pour un facteur de transcription et dont l'inactivation entraîne une altération de la croissance embryonnaire (Varrault 2006).

Dans notre étude, la diminution d'expression de *Zac1* est coordonnée et concomitante aux autres gènes soumis à l'empreinte parentale ce qui pourrait confirmer le rôle pivot de *Zac1* dans la diminution d'expression de ces gènes soumis à l'empreinte parentale après la naissance.

D'autre part, à J0, nous n'avons pas vu de différence d'expression entre les groupes pour *Grb10*, *Gnas L*, *Dlk1* et *Mest*. A J21, les niveaux d'expression de tous ces gènes soumis à l'empreinte parentale du réseau ont considérablement diminué mais aucune différence entre les groupes n'a également été observée pour *Grb10*, *Ndn*, *GnasL*, *Gil2*, *Dlk1*, *Mest* et *Igf2r*.

Mais cette diminution d'expression en période post-natale est perturbée par la supplémentation en donneurs de méthyle pour les gènes *Igf2* et *H19* dont je reparlerai plus en détails après.

Ce ralentissement de la diminution d'expression de ces deux gènes n'est pas du tout corrélé à l'expression de *Zac1*. Pourtant, il a été montré que *Zac1* régule en tant que facteur de transcription l'expression du locus *Igf2-H19* en se fixant aux enhanceurs en aval de *H19* (Varrault 2006, Arima 2005). Ces résultats contradictoires montrent que les mécanismes responsables de cette co-régulation restent largement méconnus et n'ont pas forcément de relation directe aussi simple que cela avait été avancé auparavant.

→ Le cas particulier d'*Igf2* et *H19* : expression et méthylation

Nous avons pu constater une surexpression à la naissance du gène *Igf2r* dans les groupes restreints en protéines alors que l'expression de *H19* et d'*Igf2* était légèrement diminuée dans les groupes restreints en protéines.

Malgré tout, après la naissance, une diminution d'expression de ces 3 gènes a été observée comme pour les autres GSE. Mais cette diminution d'expression a été affectée par les régimes alimentaires. En effet, *Igf2r* est sur-exprimé dans les groupes restreints en protéine alors que *H19* l'est pour les 3 groupes expérimentaux et qu'*Igf2* l'est dans les deux groupes supplémentés en donneurs de méthyle.

Cette sur-expression d'*Igf2* n'a pas été observée dans l'étude sur la restriction protéique chez la souris d'Ivanova et al (2012). Par contre, une surexpression d'*Igf2* et d'*H19* a été retrouvée à la naissance dans le foie de rats soumis à une restriction protéique (Gong 2010).

Par la suite, notre étude de la méthylation par pyroséquençage n'a pas révélé d'effets du régime alimentaire sur les niveaux de méthylation d'*Igf2*.

Ces résultats rejoignent ce qui a déjà été publié dans le domaine. Chez l'animal, une étude a montré que la restriction protéique maternelle durant la gestation ou la période postnatale précoce n'avait pas d'impact substantiel sur le niveau de méthylation des DMR de 5 GSE dont *H19* et *Igf2* (DMR1 et 2) dans le foie des descendants (Ivanova 2012). Ce même travail a mis en évidence de légères augmentations de la méthylation au niveau des DMR des gènes *Grb10* et *Gnasxl* chez des animaux âgés de 3 semaines issus de mères soumis à une restriction protéique durant la gestation. Mais ces variations de méthylation n'affectent qu'un nombre très limité de CpG et ne sont pas maintenues à l'âge adulte.

Des résultats similaires ont été observés dans une étude épidémiologique étudiant les effets d'une supplémentation en acide folique (Hoyo 2011). En effet, le profil de méthylation d'*Igf2* n'était pas modifié par la supplémentation maternelle en acide folique quelque soit la dose.

Dans notre étude, il est possible que nous n'ayons pas ciblé les bons sites CpG, puisque nous n'avons analysé qu'une partie des sites potentiels de méthylation présents dans ces régions. C'est pour cela que nous avons entrepris une étude d'analyse sans à priori de type MeDIP-seq qui devrait nous permettre d'analyser des régions beaucoup plus larges. Il est également possible que les effets sur la méthylation soient tissu spécifique pour les DMR d'*Igf2* ou alors que les DMRs ne soient pas sensibles à la nutrition précoce.

Malgré tout, il faut noter que d'autres études ont montré des variations de profil de méthylation d'*Igf2* et d'*H19* dans un contexte de famine (Tobi 2009, Heijmans 2008) ou de supplémentation en folate (Haggarty 2013, Hoyo 2011). Mais il est important de préciser que les effets observés dans ces études ne sont pas majeurs, ce qui pose la question d'une part de leur mise en évidence expérimentale et d'autre part de leur pertinence physiologique.

Par contre, nous avons pu observer une variation de faible amplitude mais statistiquement significative pour un seul CpG (CpG n°7) de l'ICR d'*H19*. En effet, le groupe C et Csup présentent un taux de méthylation statistiquement supérieur pour ce CpG. (Figure16).

Dans d'autres études, la restriction protéique n'a eu aucun impact substantiel sur le niveau de méthylation d'H19 (Ivanova 2012).

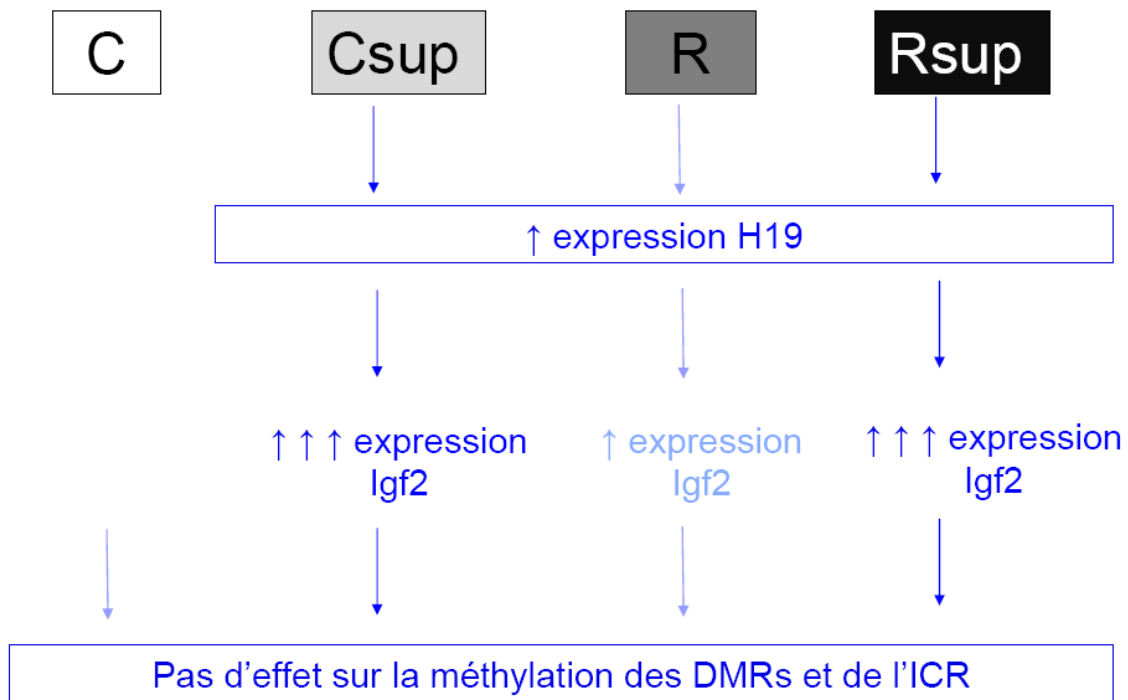


Figure 16 : Bilan de l'effet de nos régimes alimentaires maternels sur l'expression et le profil de méthylation d'Igf2 et H19 au sevrage.

Nous aurions pu penser que la supplémentation en donneur de méthyl allait augmenter le taux de méthylation au niveau du site de fixation de la protéine CTCF, qui est très fortement associée à l'expression d'Igf2. En effet, quand les CpG du site de fixation de la protéine CTCF sont méthylés, le site ne peut plus fixer la protéine « insulatrice » CTCF. Ainsi, l'ICR faisant office « d'insulateur » est inactivée permettant ainsi aux « enhancers » d'être libres d'activer l'expression paternelle d'Igf2. De plus, il a été rapporté que la protéine CTCF participerait au remodelage de la chromatine pour permettre une expression allèle spécifique des gènes H19 et Igf2 mais pas seulement. Il semblerait qu'elle puisse également jouer un rôle de régulation sur d'autres gènes soumis ou non à l'empreinte (Han 2008) (Figure 17).

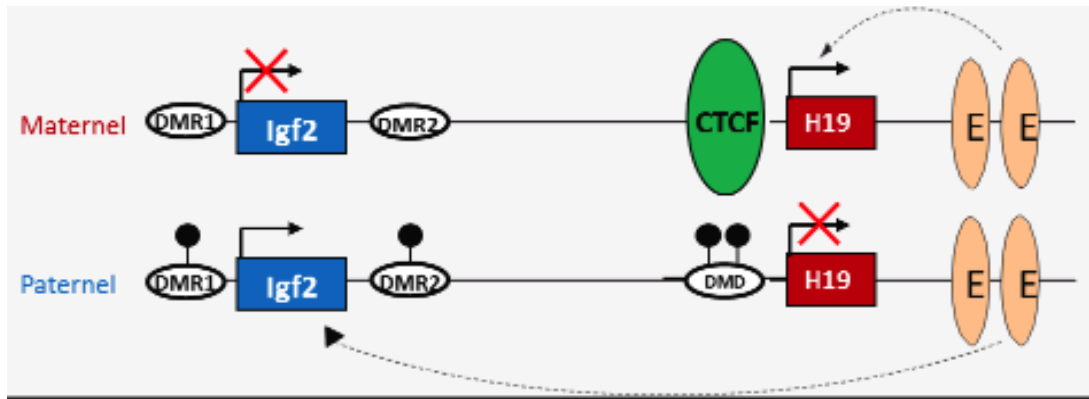


Figure 17: Organisation et régulation du locus *Igf2/H19*. *Igf2* est exprimé à partir de l'allèle paternel alors que *H19* est exprimé à partir de l'allèle maternel. Ceci est possible grâce à la méthylation des DMRs et au rôle des enhancer (E). CTCF : CCCTC-binding protein.

Des résultats comparables ont déjà été observés dans un modèle de rat soumis à une restriction protéique maternelle (Gong 2010). Dans ce modèle, une hyperméthylation au niveau de l'ICR a été retrouvée. Cette hyperméthylation étant corrigée dans cette étude par une supplémentation en acide folique. Dans notre modèle de restriction protéique, nous ne retrouvons pas cette hyperméthylation.

Cependant, nos résultats ne sont pas suffisants pour affirmer que les profils de méthylation ne sont pas perturbés par l'intervention nutritionnelle que nous avons utilisée dans notre modèle expérimental.

Une approche ciblée sur des gènes candidats comme nous l'avons fait ne permet pas d'avoir une vision globale de la méthylation. Une étude sans a priori via MedIP sequencing nous a donc semblé être une excellente opportunité de voir à plus grande échelle les effets de la programmation nutritionnelle sur la méthylation. Comme écrit précédemment, les analyses du grand nombre de données générées par ce genre d'approche sont actuellement en cours avec l'aide d'un bio informaticien.

Ces GSE sont soumis à une régulation très complexe pouvant impliquer d'autres mécanismes épigénétiques comme la méthylation des histones et/ou à plus grande échelle, des modifications de la structure de la chromatine. Il semblerait donc très intéressant de voir si la

méthylation des histones est affectée par la supplémentation en DM. Cela a déjà été mis en évidence pour le gène *Hnf4a* dans les îlots pancréatiques de rats adultes. Des variations d'expression étaient associées à des modifications d'histones avec une réduction de la méthylation et une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 (Sandovici 2011).

C'est aussi le cas du gène *Pdx1* dont l'expression était diminuée dans un modèle de ligature des artères utérines et qui était également associée à une diminution d'acétylation des histones H3 et H4 (Park 2008).

Mais cette régulation pourrait aussi largement impliquer la structure, la conformation tridimensionnelle de la chromatine (Murrell 2004) permettant ainsi l'accessibilité ou non aux facteurs de transcription.

Cette régulation pourrait aussi impliquer une régulation post-transcriptionnelle via des ARN anti-sens ou des micro-ARN (Ge 2011).

Très récemment, il a été montré qu'une augmentation d'expression aberrante de mir-141 (micro ARN) dans le placenta entraînait une diminution d'expression de ces gènes cibles comme *Zac1* et le facteur de transcription E2F3 qui affectent par la suite l'expression du gène *Igf2* puisqu'une corrélation positive a été retrouvée entre les niveaux d'expression de *Zac1* et d'*Igf2* (Tang 2013). Cette expression aberrante de mir-141 serait une des causes de la restriction de la croissance fœtale dans ce modèle, proposant ainsi de nouvelles pistes de recherche dans le domaine des mécanismes épigénétiques impliqués dans la programmation nutritionnelle.

Mais il faudrait aussi envisager le fait que la nutrition pourrait ne pas avoir d'effets sur ces GSE et leur régulation sachant qu'ils sont impliqués dans des fonctions extrêmement importantes comme la croissance et le développement. Nous pouvons aisément envisager qu'ils soient également extrêmement bien protégés face à des variations d'apports alimentaires.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le rat est un modèle d'étude extrêmement utilisé pour étudier la programmation nutritionnelle. De nombreuses données, notamment au niveau des mécanismes physiologiques sont donc à notre disposition. Il présente des avantages non négligeables comme un temps de gestation court qui est idéal pour optimiser les temps d'expérimentation animale et pour les études à long terme également. Mais ce modèle a ses limites.

En effet, l'extrapolation à l'Homme est extrêmement difficile car les mécanismes et les conséquences engendrées peuvent varier d'une espèce à une autre. Mais les études chez l'Homme sont encore limitées car il semble extrêmement difficile au niveau de la déontologie et de l'éthique d'effectuer des prélèvements invasifs chez les mères ou les enfants.

De nombreuses études se tournent donc sur l'étude de la méthylation dans les cellules sanguines qui sont parmi celles les plus facilement accessibles. Pour l'heure, elles suggèrent déjà que des différences de méthylation de l'ADN peuvent être détectées dans le sang de patients atteints de cancer même pour des tumeurs solides (Al-moundhri 2010, Hsiung 2007, Pedersen 2011).

Il y a un nombre croissant de publications comparant les différences de méthylation dans le sang de patients sains ou atteints de diverses pathologies (Chowdhury 2011, Nadeau 2010, Toperoff 2011).

L'une d'entre elles montre un profil de méthylation spécifique dans le sang de patients atteints d'un diabète de type 2 pouvant servir de biomarqueur prédictif de la maladie (Toperoff 2011). Cette approche semble aussi ouvrir de nouvelles pistes pour le diagnostic anténatal étant donné que des différences de méthylation ont été identifiées dans les leucocytes de mères ayant eu des enfants atteints d'une pathologie cardiaque congénitale (Chowdhury 2011).

Si le développement des études sur le sang humain se poursuit et que l'on montre que son profil de méthylation est représentatif de celui d'un organe cible, le sang pourra alors être utilisé pour la détection de biomarqueurs épigénétiques.

Pour finir, il me semble important de revenir et de finir cette conclusion en parlant de l'Homme. En effet, la restriction protéique de cette étude est complètement d'actualité dans les pays en développement où les apports nutritionnels ne sont pas optimaux. Mais ce modèle convient aussi parfaitement à nos pays industrialisés vu qu'il mime la réduction des échanges foeto-maternels qui sont assez régulièrement diagnostiqués. Quant à la supplémentation en

micronutriments, elle est maintenant largement accessible sans prescription et suivi médical ; pouvant alors conduire à des excès ou à de mauvaises utilisations.

→ **Micronutriment et nutrition**

Depuis 2001, les pouvoirs publics français mènent un Programme National Nutrition Santé (PNNS) qui a pour objectif d'améliorer l'état de santé de la population française en jouant sur un acteur principal de la vie : **la nutrition**. Son objectif est de proposer des recommandations fiables et scientifiquement validées pour aider la population et les professionnels du secteur à décrypter les informations parfois contradictoires que l'on entend tous les jours sur la nutrition.

C'est dans ce cadre qu'une politique nutritionnelle est apparue, au cours des dernières années, comme une priorité de santé publique. Le rôle joué par la nutrition comme facteur de protection ou de risque des pathologies les plus répandues en France est de mieux en mieux compris, qu'il s'agisse du cancer, des maladies cardiovasculaires, de l'obésité, de l'ostéoporose ou du diabète de type 2.

L'amélioration de l'état nutritionnel de la population constitue, en ce début de 21^{ème} siècle, un enjeu majeur pour les politiques de santé publique menées en France, en Europe et dans le Monde.

En toute logique, si l'on suivait les recommandations du Programme National Nutrition Santé (PNNS) et que l'on mangeait 5 portions de fruits et légumes et 3 produits laitiers chaque jour, nous ne devrions pas souffrir de carences. Mais nos modes de consommation diminuent la quantité de micronutriments ingérés et nous sommes bien souvent en dessous des apports journaliers recommandés par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation (Anses).

En effet, des études nutritionnelles réalisées ces dernières années montrent que nous sommes carencés:

- En Vit E dans 100% des cas,
- En Vit D dans 90%,
- En Zinc et Vit B6 dans 80%
- En Magnésium et Vit B1 dans 60%
- En Vit B9 et Vit C dans 50%.

Malgré le lancement du PNNS, nous sommes peu à suivre ces recommandations. La solution passe donc par une supplémentation alimentaire, dans le respect des Apports Quotidiens Recommandés (AQR) définis par le Conseil Européen. Les AQR sont fonction de l'âge, du sexe et de certaines situations particulières (grossesse, activité sportive intense...). Mais la mise en place d'une supplémentation alimentaire systématique engage de mieux comprendre et de mieux appréhender les mécanismes physiologiques qui auront un impact sur l'organisme à court et à moyen terme. La recherche dans ce domaine semble donc nécessaire et d'actualité.

Plusieurs objectifs du Programme National Nutrition Santé initialement fixés ont été partiellement atteints, comme la réduction de la prévalence du surpoids et de l'obésité chez l'enfant, la réduction de la consommation de sel ou de sucre, l'augmentation de la consommation de fruits chez les adultes.

Mais il reste encore à améliorer le statut en acide folique des femmes désireuses d'avoir des enfants. En effet, près de $\frac{3}{4}$ des femmes en âge de procréer ont des apports alimentaires en acide folique inférieurs aux apports nutritionnels conseillés (Heseker 2011, Afssa 2009). Pourtant en décembre 2004, une campagne de sensibilisation et d'information a été menée auprès des professionnels de santé pour les inciter à relayer les informations auprès des patientes et à assurer une prescription appropriée.

→ **Micronutriment et grossesse**

Sur le site internet du PNNS, accessible à tous, il est inscrit « *Sachez également que votre médecin peut le cas échéant vous prescrire un complément en vitamine B9. Demandez-lui son avis dès votre désir de grossesse.* ». Cette phrase pourrait sous-entendre que les gynécologues ne prescrivent pas ou ne proposent pas spontanément cette supplémentation en acide folique. Cela sous-entend également qu'une certaine catégorie de la population peut demander cette supplémentation si elle a conscience de ses bienfaits.

Pourtant l'INPES (Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé) incite les médecins généralistes, les gynécologues et les sages femmes à relayer largement cette recommandation encore insuffisamment connue.

En effet, en 2010, 53.5% des femmes qui ont eu un enfant n'avaient pas reçu d'acide folique. Pour les 40,3% de celles qui ont reçu une supplémentation, dans 64% des cas, la

supplémentation a été trop tardive par rapport aux recommandations. Seuls 34.2% des femmes ont reçu une supplémentation en période anténatale (Enquête nationale périnatale 2010 <http://www.sante.gouv.fr/perinatalite.html>). Et 6.2% des femmes ne savent pas si elles ont reçu de l'acide folique.

Au-delà de la poursuite des études sur les mécanismes impliqués par ces suppléments supervisés ou non par un médecin, il me semble également indispensable de promouvoir l'information chez les femmes et chez les professionnels de santé. En effet, pendant la grossesse, la mère et le fœtus courent le risque d'avoir des carences en micronutriments, par conséquent cette période mérite une attention accrue.

BIBLIOGRAPHIE

- Aihie Sayer, A., Dunn, R., Langley-Evans, S. and Cooper, C. (2001). Prenatal exposure to a maternal low protein diet shortens life span in rats. *Gerontology*. 47, (1). 9-14.
- Akyol, A., Langley-Evans, S. C. and McMullen, S. (2009). Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. *Br J Nutr*. 102, (11). 1601-10.
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M. and Smith, S. C., Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 120, (16). 1640-5.
- Alberti, K. G., Zimmet, P. and Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 366, (9491). 1059-62.
- Albright, C. D., Da Costa, K. A., Craciunescu, C. N., Klem, E., Mar, M. H. and Zeisel, S. H. (2005). Regulation of choline deficiency apoptosis by epidermal growth factor in CWSV-1 rat hepatocytes. *Cell Physiol Biochem*. 15, (1-4). 59-68.
- Allen, L. H. (2005). Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr*. 81, (5). 1206S-1212S.
- Allen, L. H. and Peerson, J. M. (2009). Impact of multiple micronutrient versus iron-folic acid supplements on maternal anemia and micronutrient status in pregnancy. *Food Nutr Bull*. 30, (4 Suppl). S527-32.
- Al-Moundhri, M. S., Al-Nabhani, M., Tarantini, L., Baccarelli, A. and Rusiecki, J. A. (2010). The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinoma. *PLoS One*. 5, (12). e15585.
- Andersen, H. S., Gambling, L., Holtrop, G. and Mcardle, H. J. (2006). Maternal iron deficiency identifies critical windows for growth and cardiovascular development in the rat postimplantation embryo. *J Nutr*. 136, (5). 1171-7.

- Antony, A. C. and Hansen, D. K. (2000). Hypothesis: folate-responsive neural tube defects and neurocristopathies. *Teratology*. 62, (1). 42-50.
- Arima, T., Kamikihara, T., Hayashida, T., Kato, K., Inoue, T., Shirayoshi, Y., Oshimura, M., Soejima, H., Mukai, T. and Wake, N. (2005). ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res.* 33, (8). 2650-60.
- Ba, Y., Yu, H., Liu, F., Geng, X., Zhu, C., Zhu, Q., Zheng, T., Ma, S., Wang, G., Li, Z. and Zhang, Y. (2011). Relationship of folate, vitamin B12 and methylation of insulin-like growth factor-II in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr.* 65, (4). 480-5.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y. and Lewin, M. J. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*. 394, (6695). 790-3.
- Bailey, P., Holowacz, T. and Lassar, A. B. (2001). The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr Opin Cell Biol.* 13, (6). 679-89.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature*. 436, (7054). 1103-6.
- Barbet, J. P., Thornell, L. E. and Butler-Browne, G. S. (1991). Immunocytochemical characterisation of two generations of fibers during the development of the human quadriceps muscle. *Mech Dev.* 35, (1). 3-11.
- Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D. and Wadsworth, M. E. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 298, (6673). 564-7.
- Barlow, D. P., Stoger, R., Herrmann, B. G., Saito, K. and Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*. 349, (6304). 84-7.
- Barroso, I., Luan, J., Wheeler, E., Whittaker, P., Wasson, J., Zeggini, E., Weedon, M. N., Hunt, S., Venkatesh, R., Frayling, T. M., Delgado, M., Neuman, R. J., Zhao, J., Sherva, R., Glaser, B., Walker, M., Hitman, G., McCarthy, M. I., Hattersley, A. T., Permutt, M. A., Wareham, N. J. and Deloukas, P. (2008). Population-specific risk of type 2 diabetes conferred by HNF4A P2 promoter variants: a lesson for replication studies. *Diabetes*. 57, (11). 3161-5.

- Bartolomei, M. S., Webber, A. L., Brunkow, M. E. and Tilghman, S. M. (1993). Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene. *Genes Dev.* 7, (9). 1663-73.
- Baskin, D. G., Wilcox, B. J., Figlewicz, D. P. and Dorsa, D. M. (1988). Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci.* 11, (3). 107-11.
- Bays, H. E. (2004). Metabolic syndrome: what might be occurring? *Manag Care.* 13, (10 Suppl). 13-6.
- Bellinger, L., Lilley, C. and Langley-Evans, S. C. (2004). Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr.* 92, (3). 513-20.
- Bellinger, L., Sculley, D. V. and Langley-Evans, S. C. (2006). Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int J Obes (Lond).* 30, (5). 729-38.
- Ben-Shlomo, Y., Mccarthy, A., Hughes, R., Tilling, K., Davies, D. and Smith, G. D. (2008). Immediate postnatal growth is associated with blood pressure in young adulthood: the Barry Caerphilly Growth Study. *Hypertension.* 52, (4). 638-44.
- Bergel, E. and Belizan, J. M. (2002). A deficient maternal calcium intake during pregnancy increases blood pressure of the offspring in adult rats. *BJOG.* 109, (5). 540-5.
- Bertram, C., Trowern, A. R., Copin, N., Jackson, A. A. and Whorwood, C. B. (2001). The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology.* 142, (7). 2841-53.
- Bhutta, Z. A., Ahmed, T., Black, R. E., Cousens, S., Dewey, K., Giugliani, E., Haider, B. A., Kirkwood, B., Morris, S. S., Sachdev, H. P. and Shekar, M. (2008). What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. *Lancet.* 371, (9610). 417-40.
- Bieswal, F., Ahn, M. T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W. D. and Remacle, C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring).* 14, (8). 1330-43.
- Bispham, J., Gopalakrishnan, G. S., Dandrea, J., Wilson, V., Budge, H., Keisler, D. H., Broughton Pipkin, F., Stephenson, T. and Symonds, M. E. (2003). Maternal endocrine

adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology*. 144, (8). 3575-85.

- Borrelli, E., Nestler, E. J., Allis, C. D. and Sassone-Corsi, P. (2008). Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*. 60, (6). 961-74.
- Bouret, S. G., Draper, S. J. and Simerly, R. B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. 304, (5667). 108-10.
- Brameld, J. M., Mostyn, A., Dandrea, J., Stephenson, T. J., Dawson, J. M., Buttery, P. J. and Symonds, M. E. (2000). Maternal nutrition alters the expression of insulin-like growth factors in fetal sheep liver and skeletal muscle. *J Endocrinol*. 167, (3). 429-37.
- Breksa, A. P., 3rd and Garrow, T. A. (2002). Random mutagenesis of the zinc-binding motif of betaine-homocysteine methyltransferase reveals that Gly 214 is essential. *Arch Biochem Biophys*. 399, (1). 73-80.
- Brenner, B. M. (1994). The etiology of adult hypertension and progressive renal injury: an hypothesis. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 149, (1-2). 121-5; discussion 125-7.
- Brenner, B. M., Garcia, D. L. and Anderson, S. (1988). Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. 1, (4 Pt 1). 335-47.
- Breton, C., Lukaszewski, M. A., Risold, P. Y., Enache, M., Guillemot, J., Riviere, G., Delahaye, F., Lesage, J., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C. and Vieau, D. (2009). Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296, (3). E462-72.
- Brissova, M., Blaha, M., Spear, C., Nicholson, W., Radhika, A., Shiota, M., Charron, M. J., Wright, C. V. and Powers, A. C. (2005). Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 288, (4). E707-14.
- Burdge, G. C., Slater-Jefferies, J., Torrens, C., Phillips, E. S., Hanson, M. A. and Lillycrop, K. A. (2007). Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr*. 97, (3). 435-9.
- Burns, S. P., Desai, M., Cohen, R. D., Hales, C. N., Iles, R. A., Germain, J. P., Going, T. C. and Bailey, R. A. (1997). Gluconeogenesis, glucose handling, and structural

changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest.* 100, (7). 1768-74.

- Cameron, A. J., Boyko, E. J., Sicree, R. A., Zimmet, P. Z., Soderberg, S., Alberti, K. G., Tuomilehto, J., Chitson, P. and Shaw, J. E. (2008). Central obesity as a precursor to the metabolic syndrome in the AusDiab study and Mauritius. *Obesity (Silver Spring)*. 16, (12). 2707-16.
- Capeau, J. (2003). [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)*. 19, (8-9). 834-9.
- Carlin, J., George, R. and Reyes, T. M. (2013). Methyl donor supplementation blocks the adverse effects of maternal high fat diet on offspring physiology. *PLoS One*. 8, (5). e63549.
- Casabiell, X., Pineiro, V., Tome, M. A., Peino, R., Dieguez, C. and Casanueva, F. F. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, (12). 4270-3.
- Cattaneo, M. (1999). Homocysteine and cardiovascular diseases. *Circulation*. 100, (25). e151.
- Charalambous, M., Da Rocha, S. T. and Ferguson-Smith, A. C. (2007). Genomic imprinting, growth control and the allocation of nutritional resources: consequences for postnatal life. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 14, (1). 3-12.
- Charalambous, M., Smith, F. M., Bennett, W. R., Crew, T. E., Mackenzie, F. and Ward, A. (2003). Disruption of the imprinted *Grb10* gene leads to disproportionate overgrowth by an *Igf2*-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, (14). 8292-7.
- Chen, J. L. and Wu, Y. (2008). Cardiovascular risk factors in Chinese American children: associations between overweight, acculturation, and physical activity. *J Pediatr Health Care.* 22, (2). 103-10.
- Cherala, G., Shapiro, B. H. and D'mello a, P. (2006). Two low protein diets differentially affect food consumption and reproductive performance in pregnant and lactating rats and long-term growth in their offspring. *J Nutr.* 136, (11). 2827-33.
- Chmurzynska, A., Stachowiak, M., Gawecki, J., Pruszyńska-Oszmalek, E. and Tubacka, M. (2012). Protein and folic acid content in the maternal diet determine lipid

metabolism and response to high-fat feeding in rat progeny in an age-dependent manner. *Genes Nutr.* 7, (2). 223-34.

- Chowdhury, S., Erickson, S. W., Macleod, S. L., Cleves, M. A., Hu, P., Karim, M. A. and Hobbs, C. A. (2011). Maternal genome-wide DNA methylation patterns and congenital heart defects. *PLoS One.* 6, (1). e16506.
- Cianfarani, S., Germani, D. and Branca, F. (1999). Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 81, (1). F71-3.
- Cinti, S. (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc.* 60, (3). 319-28.
- Cooper, W. N., Khulan, B., Owens, S., Elks, C. E., Seidel, V., Prentice, A. M., Belteki, G., Ong, K. K., Affara, N. A., Constancia, M. and Dunger, D. B. (2012). DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptional micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial. *FASEB J.* 26, (5). 1782-90.
- Coppack, S. W. (2005). Adipose tissue changes in obesity. *Biochem Soc Trans.* 33, (Pt 5). 1049-52.
- Costello, A. M. and Osrin, D. (2003). Micronutrient status during pregnancy and outcomes for newborn infants in developing countries. *J Nutr.* 133, (5 Suppl 2). 1757S-1764S.
- Costello, J. F., Plass, C. and Cavenee, W. K. (2002). Restriction landmark genome scanning. *Methods Mol Biol.* 200, 53-70.
- Cottone, P., Sabino, V., Roberto, M., Bajo, M., Pockros, L., Frihauf, J. B., Fekete, E. M., Steardo, L., Rice, K. C., Grigoriadis, D. E., Conti, B., Koob, G. F. and Zorrilla, E. P. (2009). CRF system recruitment mediates dark side of compulsive eating. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, (47). 20016-20.
- Cottrell, E. C., Martin-Gronert, M. S., Fernandez-Twinn, D. S., Luan, J., Berends, L. M. and Ozanne, S. E. (2011). Leptin-independent programming of adult body weight and adiposity in mice. *Endocrinology.* 152, (2). 476-82.
- Coupe, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A. and Parnet, P. (2010). Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology.* 151, (2). 702-13.

- Coupe, B., Grit, I., Darmaun, D. and Parnet, P. (2009). The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297, (3). R813-24.
- Craciunescu, C. N., Albright, C. D., Mar, M. H., Song, J. and Zeisel, S. H. (2003). Choline availability during embryonic development alters progenitor cell mitosis in developing mouse hippocampus. *J Nutr.* 133, (11). 3614-8.
- Czeizel, A. E. (1993). Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ.* 306, (6893). 1645-8.
- Da Costa, K. A., Badea, M., Fischer, L. M. and Zeisel, S. H. (2004). Elevated serum creatine phosphokinase in choline-deficient humans: mechanistic studies in C2C12 mouse myoblasts. *Am J Clin Nutr.* 80, (1). 163-70.
- Da Costa, K. A., Gaffney, C. E., Fischer, L. M. and Zeisel, S. H. (2005). Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *Am J Clin Nutr.* 81, (2). 440-4.
- Da Silva Aragao, R., Guzman-Quevedo, O., Perez-Garcia, G., Toscano, A. E., Gois Leandro, C., Manhaes-De-Castro, R. and Bolanos-Jimenez, F. (2013). Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. *Acta Physiol (Oxf).*
- Dallongeville, J., Cottel, D., Arveiler, D., Tauber, J. P., Bingham, A., Wagner, A., Fauvel, J., Ferrieres, J., Ducimetiere, P. and Amouyel, P. (2004). The association of metabolic disorders with the metabolic syndrome is different in men and women. *Ann Nutr Metab.* 48, (1). 43-50.
- Dauncey, M. J. and Gilmour, R. S. (1996). Regulatory factors in the control of muscle development. *Proc Nutr Soc.* 55, (1B). 543-59.
- Davidowa, H. and Plagemann, A. (2000). Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. *Neurosci Lett.* 293, (1). 21-4.
- Davidowa, H. and Plagemann, A. (2001). Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport.* 12, (15). 3201-4.
- Davison, J. M., Mellott, T. J., Kovacheva, V. P. and Blusztajn, J. K. (2009). Gestational choline supply regulates methylation of histone H3, expression of histone

methyltransferases G9a (Kmt1c) and Suv39h1 (Kmt1a), and DNA methylation of their genes in rat fetal liver and brain. *J Biol Chem.* 284, (4). 1982-9.

- De Courten, M., Zimmet, P., Hodge, A., Collins, V., Nicolson, M., Staten, M., Dowse, G. and Alberti, K. G. (1997). Hyperleptinaemia: the missing link in the, metabolic syndrome? *Diabet Med.* 14, (3). 200-8.
- Dechiara, T. M., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell.* 64, (4). 849-59.
- Delahaye, F., Breton, C., Risold, P. Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J. and Vieau, D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology.* 149, (2). 470-5.
- Desai, M., Byrne, C. D., Zhang, J., Petry, C. J., Lucas, A. and Hales, C. N. (1997). Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. *Am J Physiol.* 272, (5 Pt 1). G1083-90.
- Desai, M., Crowther, N. J., Lucas, A. and Hales, C. N. (1996). Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr.* 76, (4). 591-603.
- Desai, M., Crowther, N. J., Ozanne, S. E., Lucas, A. and Hales, C. N. (1995). Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans.* 23, (2). 331-5.
- Devlin, A. M., Arning, E., Bottiglieri, T., Faraci, F. M., Rozen, R. and Lentz, S. R. (2004). Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood.* 103, (7). 2624-9.
- Dolinoy, D. C. (2008). The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev.* 66 Suppl 1, S7-11.
- Duhl, D. M., Vrieling, H., Miller, K. A., Wolff, G. L. and Barsh, G. S. (1994). Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat Genet.* 8, (1). 59-65.
- Dwyer, C. M., Stickland, N. C. and Fletcher, J. M. (1994). The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *J Anim Sci.* 72, (4). 911-7.

- Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Flier, J. S., Saper, C. B. and Elmquist, J. K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*. 23, (4). 775-86.
- Eriksson, J. G., Forsen, T., Tuomilehto, J., Osmond, C. and Barker, D. J. (2001). Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ*. 322, (7292). 949-53.
- Eriksson, J. W., Smith, U., Waagstein, F., Wysocki, M. and Jansson, P. A. (1999). Glucose turnover and adipose tissue lipolysis are insulin-resistant in healthy relatives of type 2 diabetes patients: is cellular insulin resistance a secondary phenomenon? *Diabetes*. 48, (8). 1572-8.
- Fanca-Berthon, P., Michel, C., Pagniez, A., Rival, M., Van Seuningen, I., Darmaun, D. and Hoebler, C. (2009). Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatr Res*. 66, (1). 47-52.
- Ferguson-Smith, A. C., Sasaki, H., Cattanach, B. M. and Surani, M. A. (1993). Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature*. 362, (6422). 751-5.
- Fernandez-Twinn, D. S., Wayman, A., Ekizoglou, S., Martin, M. S., Hales, C. N. and Ozanne, S. E. (2005). Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288, (2). R368-73.
- Feve, B., Bastard, J. P. and Vidal, H. (2006). [Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts]. *C R Biol*. 329, (8). 587-97; discussion 653-5.
- Fife J, Raniga S, Hider PN, Frizelle FA. (2011). Folic acid supplementation and colorectal cancer risk: & meta-analysis. *colorectal Dis*. 13(2):132-7.
- Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1, (5). 228-37.
- Finkelstein, J. D. and Martin, J. J. (1986). Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem*. 261, (4). 1582-7.
- Forsen, T., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Notkola, I. L., Eriksson, J. and Vinni, S. (1998). Growth in childhood and blood pressure in Finnish children. *J Hum Hypertens*. 12, (6). 397-402.

- Fowden, A. L. and Forhead, A. J. (2004). Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction*. 127, (5). 515-26.
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B. B. and Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1, (12). 1311-4.
- Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev*. 15, (5). 490-5.
- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P. and Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*. 278, (6). 4035-40.
- Gambling, L., Dunford, S. and Mcardle, H. J. (2004). Iron deficiency in the pregnant rat has differential effects on maternal and fetal copper levels. *J Nutr Biochem*. 15, (6). 366-72.
- Garofano, A., Czernichow, P. and Breant, B. (1997). In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia*. 40, (10). 1231-4.
- Garofano, A., Czernichow, P. and Breant, B. (1998). Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia*. 41, (9). 1114-20.
- Ge, Y., Sun, Y. and Chen, J. (2011). IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *J Cell Biol*. 192, (1). 69-81.
- Giudicelli, F., Brabant, A. L., Grit, I., Parnet, P. and Amarger, V. (2013). Excess of methyl donor in the perinatal period reduces postnatal leptin secretion in rat and interacts with the effect of protein content in diet. *PLoS One*. 8, (7). e68268.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D. and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 128, (4). 635-8.
- Gong, L., Pan, Y. X. and Chen, H. (2010). Gestational low protein diet in the rat mediates *Igf2* gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation. *Epigenetics*. 5, (7). 619-26.
- Gonzalez-Bulnes, A., Ovilo, C., Lopez-Bote, C. J., Astiz, S., Ayuso, M., Perez-Solana, M. L., Sanchez-Sanchez, R. and Torres-Rovira, L. (2012). Gender-specific early postnatal catch-up growth after intrauterine growth retardation by food restriction in swine with obesity/leptin resistance. *Reproduction*. 144, (2). 269-78.

- Greenwood, P. L., Hunt, A. S., Hermanson, J. W. and Bell, A. W. (2000). Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. *J Anim Sci.* 78, (1). 50-61.
- Griffin, M. E., Marcucci, M. J., Cline, G. W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L. J., Kraegen, E. W., White, M. F. and Shulman, G. I. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 48, (6). 1270-4.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. and Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, (5). 367-77.
- Gunton, J. E., Kulkarni, R. N., Yim, S., Okada, T., Hawthorne, W. J., Tseng, Y. H., Roberson, R. S., Ricordi, C., O'connell, P. J., Gonzalez, F. J. and Kahn, C. R. (2005). Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell.* 122, (3). 337-49.
- Haggarty, P., Hoad, G., Campbell, D. M., Horgan, G. W., Piyathilake, C. and Mcneill, G. (2013). Folate in pregnancy and imprinted gene and repeat element methylation in the offspring. *Am J Clin Nutr.* 97, (1). 94-9.
- Hales, C. N. and Barker, D. J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 60, 5-20.
- Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C. and Winter, P. D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 303, (6809). 1019-22.
- Hales, C. N., Desai, M., Ozanne, S. E. and Crowther, N. J. (1996). Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans.* 24, (2). 341-50.
- Ham, J. N., Crutchlow, M. F., Desai, B. M., Simmons, R. A. and Stoffers, D. A. (2009). Exendin-4 normalizes islet vascularity in intrauterine growth restricted rats: potential role of VEGF. *Pediatr Res.* 66, (1). 42-6.
- Han, L., Lee, D. H. and Szabo, P. E. (2008). CTCF is the master organizer of domain-wide allele-specific chromatin at the H19/Igf2 imprinted region. *Mol Cell Biol.* 28, (3). 1124-35.
- Han, R., Li, A., Li, L., Kitlinska, J. B. and Zukowska, Z. (2012). Maternal low-protein diet up-regulates the neuropeptide Y system in visceral fat and leads to abdominal

obesity and glucose intolerance in a sex- and time-specific manner. *FASEB J.* 26, (8). 3528-36.

- Hediger, M. L., Overpeck, M. D., Kuczmarski, R. J., Mcglynn, A., Maurer, K. R. and Davis, W. W. (1998). Muscularity and fatness of infants and young children born small- or large-for-gestational-age. *Pediatrics.* 102, (5). E60.
- Heidel, E., Plagemann, A. and Davidowa, H. (1999). Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *Neuroreport.* 10, (9). 1827-31.
- Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E. and Lumey, L. H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, (44). 17046-9.
- Herman, J. G. and Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 349, (21). 2042-54.
- Hibbard, B. M. (1964). The Role of Folic Acid in Pregnancy; with Particular Reference to Anaemia, Abruption and Abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 71, 529-42.
- Holland, A. M., Gonez, L. J., Naselli, G., Macdonald, R. J. and Harrison, L. C. (2005). Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. *Diabetes.* 54, (9). 2586-95.
- Holmes-Mcnary, M. Q., Baldwin, A. S., Jr. and Zeisel, S. H. (2001). Opposing regulation of choline deficiency-induced apoptosis by p53 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 276, (44). 41197-204.
- Honein, M. A., Paulozzi, L. J., Mathews, T. J., Erickson, J. D. and Wong, L. Y. (2001). Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA.* 285, (23). 2981-6.
- Houseknecht, K. L., Mcguire, M. K., Portocarrero, C. P., Mcguire, M. A. and Beerman, K. (1997). Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun.* 240, (3). 742-7.
- Hoyo, C., Murtha, A. P., Schildkraut, J. M., Jirtle, R. L., Demark-Wahnefried, W., Forman, M. R., Iversen, E. S., Kurtzberg, J., Overcash, F., Huang, Z. and Murphy, S.

- K. (2011). Methylation variation at IGF2 differentially methylated regions and maternal folic acid use before and during pregnancy. *Epigenetics*. 6, (7). 928-36.
- Hsiung, D. T., Marsit, C. J., Houseman, E. A., Eddy, K., Furniss, C. S., Mcclean, M. D. and Kelsey, K. T. (2007). Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16, (1). 108-14.
 - Huan, J. N., Li, J., Han, Y., Chen, K., Wu, N. and Zhao, A. Z. (2003). Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J Biol Chem*. 278, (46). 45638-50.
 - Hughson, M., Farris, A. B., 3rd, Douglas-Denton, R., Hoy, W. E. and Bertram, J. F. (2003). Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int*. 63, (6). 2113-22.
 - Hypponen, E., Leon, D. A., Kenward, M. G. and Lithell, H. (2001). Prenatal growth and risk of occlusive and haemorrhagic stroke in Swedish men and women born 1915-29: historical cohort study. *BMJ*. 323, (7320). 1033-4.
 - Ingenbleek, Y. and Mccully, K. S. (2011). Vegetarianism produces subclinical malnutrition, hyperhomocysteinemia and atherogenesis. *Nutrition*. 28, (2). 148-53.
 - Ivanova, E., Chen, J. H., Segonds-Pichon, A., Ozanne, S. E. and Kelsey, G. (2012). DNA methylation at differentially methylated regions of imprinted genes is resistant to developmental programming by maternal nutrition. *Epigenetics*. 7, (10). 1200-10.
 - Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X. and Jacobsen, S. E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*. 416, (6880). 556-60.
 - Jaquet, D., Deghmoun, S., Chevenne, D., Collin, D., Czernichow, P. and Levy-Marchal, C. (2005). Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia*. 48, (5). 849-55.
 - Jaquet, D., Leger, J., Levy-Marchal, C., Oury, J. F. and Czernichow, P. (1998). Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*. 83, (4). 1243-6.
 - Jiang, X., Yan, J., West, A. A., Perry, C. A., Malysheva, O. V., Devapatla, S., Pressman, E., Vermeulen, F. and Caudill, M. A. (2012). Maternal choline intake alters

the epigenetic state of fetal cortisol-regulating genes in humans. *FASEB J.* 26, (8). 3563-74.

- Jirtle, R. L. and Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet.* 8, (4). 253-62.
- Johnson, P. M. and Kenny, P. J. (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci.* 13, (5). 635-41.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. and Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature.* 371, (6498). 606-9.
- Jousse, C., Parry, L., Lambert-Langlais, S., Maurin, A. C., Averous, J., Bruhat, A., Carraro, V., Tost, J., Letteron, P., Chen, P., Jockers, R., Launay, J. M., Mallet, J. and Fafournoux, P. (2011). Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J.* 25, (9). 3271-8.
- Jullien, D. (2008). [Pathogenesis of the metabolic syndrome]. *Ann Dermatol Venereol.* 135 Suppl 4, S243-8.
- Kabilov, M. R., Pyshnyi, D. V., Dymshits, G. M., Gashnikova, N. M., Pokrovskii, A. G., Zarytova, V. F. and Ivanova, E. M. (2002). [A new approach to detect a particular DNA sequence by UV-immobilization of its hybridization complex with a highly specific probe resulting from ligation of a tandem of short oligonucleotides in solution]. *Mol Biol (Mosk).* 36, (3). 424-31.
- Kahn, B. B. and Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 106, (4). 473-81.
- Kahn, H. S., Narayan, K. M., Williamson, D. F. and Valdez, R. (2000). Relation of birth weight to lean and fat thigh tissue in young men. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24, (6). 667-72.
- Karpe, F., Fielding, B. A., Coppack, S. W., Lawrence, V. J., Macdonald, I. A. and Frayn, K. N. (2005). Oscillations of fatty acid and glycerol release from human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes.* 54, (5). 1297-303.
- Keith, M. E., Ball, A., Jeejeebhoy, K. N., Kurian, R., Butany, J., Dawood, F., Wen, W. H., Madapallimattam, A. and Sole, M. J. (2001). Conditioned nutritional deficiencies in the cardiomyopathic hamster heart. *Can J Cardiol.* 17, (4). 449-58.

- Khan, I. Y., Taylor, P. D., Dekou, V., Seed, P. T., Lakasing, L., Graham, D., Dominiczak, A. F., Hanson, M. A. and Poston, L. (2003). Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension*. 41, (1). 168-75.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 116, (2). 259-72.
- Kiberstis, P. A. (2005). A surfeit of Suspects. *Science*. 307, (5708). 369.
- Krechowec, S. O., Vickers, M., Gertler, A. and Breier, B. H. (2006). Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol*. 189, (2). 355-63.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G. and Gruters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 19, (2). 155-7.
- Kubota, T., Miyake, K. and Hirasawa, T. (2013). The mechanisms of epigenetic modifications during DNA replication. In: *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. D. Stuart (Ed), (Eds), Chapter 13. Pages 333-350. ISBN : 978-953-51-0991-4.
- Kulkarni, A., Chavan-Gautam, P., Mehendale, S., Yadav, H. and Joshi, S. (2011). Global DNA methylation patterns in placenta and its association with maternal hypertension in pre-eclampsia. *DNA Cell Biol*. 30, (2). 79-84.
- Kulkarni, R. N., Jhala, U. S., Winnay, J. N., Krajewski, S., Montminy, M. and Kahn, C. R. (2004). PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J Clin Invest*. 114, (6). 828-36.
- Lane, R. H., Crawford, S. E., Flozak, A. S. and Simmons, R. A. (1999). Localization and quantification of glucose transporters in liver of growth-retarded fetal and neonatal rats. *Am J Physiol*. 276, (1 Pt 1). E135-42.
- Lane, R. H., Flozak, A. S., Ogata, E. S., Bell, G. I. and Simmons, R. A. (1996). Altered hepatic gene expression of enzymes involved in energy metabolism in the growth-retarded fetal rat. *Pediatr Res*. 39, (3). 390-4.
- Langley-Evans, S. C. (1996). Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrient interactions. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 114, (4). 327-33.
- Langley-Evans, S. C. and Nwagwu, M. (1998). Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sci*. 63, (7). 605-15.

- Langley-Evans, S. C., Phillips, G. J. and Jackson, A. A. (1994). In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clin Nutr.* 13, (5). 319-24.
- Langley-Evans, S. C., Welham, S. J., Sherman, R. C. and Jackson, A. A. (1996). Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond).* 91, (5). 607-15.
- Larciprete, G., Valensise, H., Di Pierro, G., Vasapollo, B., Casalino, B., Arduini, D., Jarvis, S. and Cirese, E. (2005). Intrauterine growth restriction and fetal body composition. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 26, (3). 258-62.
- Larsson, L., Aperia, A. and Wilton, P. (1980). Effect of normal development on compensatory renal growth. *Kidney Int.* 18, (1). 29-35.
- Lau, D. C., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P. E. and Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288, (5). H2031-41.
- Law, C. M., Shiell, A. W., Newsome, C. A., Syddall, H. E., Shinebourne, E. A., Fayers, P. M., Martyn, C. N. and De Swiet, M. (2002). Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age. *Circulation.* 105, (9). 1088-92.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. and Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 379, (6566). 632-5.
- Lewandowski, K., Horn, R., O'callaghan, C. J., Dunlop, D., Medley, G. F., O'hare, P. and Brabant, G. (1999). Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, (1). 300-6.
- Lillycrop, K. A., Phillips, E. S., Jackson, A. A., Hanson, M. A. and Burdge, G. C. (2005). Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr.* 135, (6). 1382-6.
- Linnemann, K., Malek, A., Sager, R., Blum, W. F., Schneider, H. and Fusch, C. (2000). Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, (11). 4298-301.
- Lucifero, D., Mann, M. R., Bartolomei, M. S. and Trasler, J. M. (2004). Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet.* 13, (8). 839-49.

- Lui, J. C., Finkelstein, G. P., Barnes, K. M. and Baron, J. (2008). An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295, (1). R189-96.
- Ly, A., Lee, H., Chen, J., Sie, K. K., Renlund, R., Medline, A., Sohn, K. J., Croxford, R., Thompson, L. U. and Kim, Y. I. (2011). Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. *Cancer Res.* 71, (3). 988-97.
- Maison, P., Byrne, C. D., Hales, C. N., Day, N. E. and Wareham, N. J. (2001). Do different dimensions of the metabolic syndrome change together over time? Evidence supporting obesity as the central feature. *Diabetes Care.* 24, (10). 1758-63.
- Maloney, C. A., Hay, S. M., Young, L. E., Sinclair, K. D. and Rees, W. D. (2011). A methyl-deficient diet fed to rat dams during the peri-conception period programs glucose homeostasis in adult male but not female offspring. *J Nutr.* 141, (1). 95-100.
- Maltin, C. A., Delday, M. I., Sinclair, K. D., Steven, J. and Sneddon, A. A. (2001). Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. *Reproduction.* 122, (3). 359-74.
- Martin, C. and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, (11). 838-49.
- Mathews, F., Youngman, L. and Neil, A. (2004). Maternal circulating nutrient concentrations in pregnancy: implications for birth and placental weights of term infants. *Am J Clin Nutr.* 79, (1). 103-10.
- Matsueda, S. and Niiyama, Y. (1982). The effects of excess amino acids on maintenance of pregnancy and fetal growth in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 28, (5). 557-73.
- Mayer, E. J., Newman, B., Austin, M. A., Zhang, D., Quesenberry, C. P., Jr., Edwards, K. and Selby, J. V. (1996). Genetic and environmental influences on insulin levels and the insulin resistance syndrome: an analysis of women twins. *Am J Epidemiol.* 143, (4). 323-32.
- Mcgarry, J. D. (2002). Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 51, (1). 7-18.
- Mcgrath, J. and Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool.* 228, (2). 355-62.

- Mcgrath, J. and Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*. 220, (4603). 1300-2.
- McKay, J. A., Wong, Y. K., Relton, C. L., Ford, D. and Mathers, J. C. (2011). Maternal folate supply and sex influence gene-specific DNA methylation in the fetal gut. *Mol Nutr Food Res*. 55, (11). 1717-23.
- McLaren, L. (2007). Socioeconomic status and obesity. *Epidemiol Rev*. 29, 29-48.
- Mcmillen, I. C. and Robinson, J. S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. 85, (2). 571-633.
- Meaney, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., Laplante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J. R. and Plotsky, P. M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci*. 18, (1-2). 49-72.
- Meck, W. H. and Williams, C. L. (2003). Metabolic imprinting of choline by its availability during gestation: implications for memory and attentional processing across the lifespan. *Neurosci Biobehav Rev*. 27, (4). 385-99.
- Mehedint, M. G. and Zeisel, S. H. (2013). Choline's role in maintaining liver function: new evidence for epigenetic mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 16, (3). 339-45.
- Mellott, T. J., Follettie, M. T., Diesl, V., Hill, A. A., Lopez-Coviella, I. and Blusztajn, J. K. (2007). Prenatal choline availability modulates hippocampal and cerebral cortical gene expression. *FASEB J*. 21, (7). 1311-23.
- Melzner, I., Scott, V., Dorsch, K., Fischer, P., Wabitsch, M., Bruderlein, S., Hasel, C. and Moller, P. (2002). Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem*. 277, (47). 45420-7.
- Mesquita, F. F., Gontijo, J. A. and Boer, P. A. (2010). Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res*. 43, (11). 1010-8.
- Mesquita, F. F., Gontijo, J. A. and Boer, P. A. (2010). Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant*. 25, (2). 380-8.
- Miller, J. W., Nadeau, M. R., Smith, J., Smith, D. and Selhub, J. (1994). Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J*. 298 (Pt 2), 415-9.

- Miralles, O., Sanchez, J., Palou, A. and Pico, C. (2006). A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity (Silver Spring)*. 14, (8). 1371-7.
- Moore, T. and Haig, D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.* 7, (2). 45-9.
- Morris, T. J., Vickers, M., Gluckman, P., Gilmour, S. and Affara, N. (2009). Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the developmental variations in metabolic traits. *PLoS One*. 4, (9). e7271.
- Murphy, S. K. and Jirtle, R. L. (2003). Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays*. 25, (6). 577-88.
- Murrell, A., Heeson, S. and Reik, W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet.* 36, (8). 889-93.
- Nadeau, K., McDonald-Hyman, C., Noth, E. M., Pratt, B., Hammond, S. K., Balmes, J. and Tager, I. (2010). Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 126, (4). 845-852 e10.
- Nelen, W. L., Blom, H. J., Steegers, E. A., Den Heijer, M. and Eskes, T. K. (2000). Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 74, (6). 1196-9.
- Niculescu, M. D., Craciunescu, C. N. and Zeisel, S. H. (2006). Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *FASEB J.* 20, (1). 43-9.
- Nijland, M. J., Ford, S. P. and Nathanielsz, P. W. (2008). Prenatal origins of adult disease. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 20, (2). 132-8.
- Nivoit, P., Morens, C., Van Assche, F. A., Jansen, E., Poston, L., Remacle, C. and Reusens, B. (2009). Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia.* 52, (6). 1133-42.
- Noga, A. A. and Vance, D. E. (2003). Insights into the requirement of phosphatidylcholine synthesis for liver function in mice. *J Lipid Res.* 44, (10). 1998-2005.
- Nuyt, A. M. and Alexander, B. T. (2009). Developmental programming and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 18, (2). 144-52.

- Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I. and Young, R. A. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*. 303, (5662). 1378-81.
- Ogata, E. S., Swanson, S. L., Collins, J. W., Jr. and Finley, S. L. (1990). Intrauterine growth retardation: altered hepatic energy and redox states in the fetal rat. *Pediatr Res*. 27, (1). 56-63.
- Ong, K. K. and Dunger, D. B. (2000). Thrifty genotypes and phenotypes in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 13 Suppl 6, 1419-24.
- Ooi, S. K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S. P., Allis, C. D., Cheng, X. and Bestor, T. H. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*. 448, (7154). 714-7.
- Oren, A., Vos, L. E., Uiterwaal, C. S., Gorissen, W. H., Grobbee, D. E. and Bots, M. L. (2004). Birth weight and carotid intima-media thickness: new perspectives from the atherosclerosis risk in young adults (ARYA) study. *Ann Epidemiol*. 14, (1). 8-16.
- Orozco-Solis, R., Lopes De Souza, S., Barbosa Matos, R. J., Grit, I., Le Bloch, J., Nguyen, P., Manhaes De Castro, R. and Bolanos-Jimenez, F. (2009). Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav*. 96, (3). 481-92.
- Orozco-Solis, R., Matos, R. J., Lopes De Souza, S., Grit, I., Kaeffer, B., Manhaes De Castro, R. and Bolanos-Jimenez, F. (2011). Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 35, (7). 990-1000.
- Ozanne, S. E. and Constancia, M. (2007). Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 3, (7). 539-46.
- Ozanne, S. E. and Hales, C. N. (2004). Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature*. 427, (6973). 411-2.
- Ozanne, S. E., Olsen, G. S., Hansen, L. L., Tingey, K. J., Nave, B. T., Wang, C. L., Hartil, K., Petry, C. J., Buckley, A. J. and Mosthaf-Seedorf, L. (2003). Early growth

restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol.* 177, (2). 235-41.

- Ozanne, S. E., Sandovici, I. and Constancia, M. (2011). Maternal diet, aging and diabetes meet at a chromatin loop. *Aging (Albany NY)*. 3, (5). 548-54.
- Ozanne, S. E., Smith, G. D., Tikerpae, J. and Hales, C. N. (1996). Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol.* 270, (4 Pt 1). E559-64.
- Padoan, A., Rigano, S., Ferrazzi, E., Beaty, B. L., Battaglia, F. C. and Galan, H. L. (2004). Differences in fat and lean mass proportions in normal and growth-restricted fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 191, (4). 1459-64.
- Palou, A., Sanchez, J. and Pico, C. (2009). Nutrient-gene interactions in early life programming: leptin in breast milk prevents obesity later on in life. *Adv Exp Med Biol.* 646, 95-104.
- Palou, M., Torrens, J. M., Priego, T., Sanchez, J., Palou, A. and Pico, C. (2011). Moderate caloric restriction in lactating rats programs their offspring for a better response to HF diet feeding in a sex-dependent manner. *J Nutr Biochem.* 22, (6). 574-84.
- Park, J. H., Stoffers, D. A., Nicholls, R. D. and Simmons, R. A. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest.* 118, (6). 2316-24.
- Paulsen, M., El-Maarri, O., Engemann, S., Stroedicke, M., Franck, O., Davies, K., Reinhardt, R., Reik, W. and Walter, J. (2000). Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith-Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse. *Hum Mol Genet.* 9, (12). 1829-41.
- Pedersen, K. S., Bamlet, W. R., Oberg, A. L., De Andrade, M., Matsumoto, M. E., Tang, H., Thibodeau, S. N., Petersen, G. M. and Wang, L. (2011). Leukocyte DNA methylation signature differentiates pancreatic cancer patients from healthy controls. *PLoS One.* 6, (3). e18223.
- Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J. J. and Hill, D. J. (1999). A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology.* 140, (10). 4861-73.

- Pham, T. D., MacLennan, N. K., Chiu, C. T., Laksana, G. S., Hsu, J. L. and Lane, R. H. (2003). Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285, (5). R962-70.
- Phillips, D. I., Barker, D. J., Fall, C. H., Seckl, J. R., Whorwood, C. B., Wood, P. J. and Walker, B. R. (1998). Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab.* 83, (3). 757-60.
- Pico, C., Sanchez, J., Oliver, P., Miralles, O., Ceresi, E. and Palou, A. (2007). Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the post-natal period. *Genes Nutr.* 2, (1). 139-41.
- Pigeyre, M., Dauchet, L., Simon, C., Bongard, V., Bingham, A., Arveiler, D., Ruidavets, J. B., Wagner, A., Ferrieres, J., Amouyel, P. and Dallongeville, J. (2011). Effects of occupational and educational changes on obesity trends in France: the results of the MONICA-France survey 1986-2006. *Prev Med.* 52, (5). 305-9.
- Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K. and Dudenhausen, J. W. (2009). Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol.* 587, (Pt 20). 4963-76.
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W. and Dorner, G. (2000). Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr.* 130, (10). 2582-9.
- Plagemann, A., Waas, T., Harder, T., Rittel, F., Ziska, T. and Rohde, W. (2000). Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides.* 34, (1). 1-6.
- Pond, W. G., Yen, J. T., Mersmann, H. J. and Maurer, R. R. (1990). Reduced mature size in progeny of swine severely restricted in protein intake during pregnancy. *Growth Dev Aging.* 54, (3). 77-84.
- Popkin, B. M. (2002). The shift in stages of the nutrition transition in the developing world differs from past experiences! *Public Health Nutr.* 5, (1A). 205-14.
- Portha, B., Chavey, A. and Movassat, J. (2011). Early-life origins of type 2 diabetes: fetal programming of the beta-cell mass. *Exp Diabetes Res.* 2011, 105076.

- Prakash, Y. S., Fournier, M. and Sieck, G. C. (1993). Effects of prenatal undernutrition on developing rat diaphragm. *J Appl Physiol.* 75, (3). 1044-52.
- Prentice, A. M. (2006). The emerging epidemic of obesity in developing countries. *Int J Epidemiol.* 35, (1). 93-9.
- Puelles, V. G., Hoy, W. E., Hughson, M. D., Diouf, B., Douglas-Denton, R. N. and Bertram, J. F. (2011). Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 20, (1). 7-15.
- Ramakrishnan, U., Grant, F. K., Goldenberg, T., Bui, V., Imdad, A. and Bhutta, Z. A. (2012). Effect of multiple micronutrient supplementation on pregnancy and infant outcomes: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 26 Suppl 1, 153-67.
- Rees, W. D., Wilson, F. A. and Maloney, C. A. (2006). Sulfur amino acid metabolism in pregnancy: the impact of methionine in the maternal diet. *J Nutr.* 136, (6 Suppl). 1701S-1705S.
- Reeves, P. G. (1997). Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 127, (5 Suppl). 838S-841S.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, G. C., Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123, (11). 1939-51.
- Regina, M., Korhonen, V. P., Smith, T. K., Alakuijala, L. and Eloranta, T. O. (1993). Methionine toxicity in the rat in relation to hepatic accumulation of S-adenosylmethionine: prevention by dietary stimulation of the hepatic transsulfuration pathway. *Arch Biochem Biophys.* 300, (2). 598-607.
- Reik, W., Davies, K., Dean, W., Kelsey, G. and Constancia, M. (2001). Imprinted genes and the coordination of fetal and postnatal growth in mammals. *Novartis Found Symp.* 237, 19-31; discussion 31-42.
- Rich-Edwards, J. W., Kleinman, K., Michels, K. B., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rexrode, K. M., Hibert, E. N. and Willett, W. C. (2005). Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *BMJ.* 330, (7500). 1115.
- Rolland, P. H., Friggi, A., Barlatier, A., Piquet, P., Latrille, V., Faye, M. M., Guillou, J., Charpiot, P., Bodard, H., Ghiringhelli, O. and Et Al. (1995). Hyperhomocysteinemia-

induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation*. 91, (4). 1161-74.

- Roseboom, T. J., Van Der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C. and Bleker, O. P. (2000). Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr*. 72, (5). 1101-6.
- Sagawa, N., Yura, S., Itoh, H., Kakui, K., Takemura, M., Nuamah, M. A., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Nakao, K. and Fujii, S. (2002). Possible role of placental leptin in pregnancy: a review. *Endocrine*. 19, (1). 65-71.
- Samuelsson, A. M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H., Piersma, A. H., Ozanne, S. E., Twinn, D. F., Remale, C., Rowlerson, A., Poston, L. and Taylor, P. D. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*. 51, (2). 383-92.
- Sandovici, I., Smith, N. H., Nitert, M. D., Ackers-Johnson, M., Uribe-Lewis, S., Ito, Y., Jones, R. H., Marquez, V. E., Cairns, W., Tadayyon, M., O'Neill, L. P., Murrell, A., Ling, C., Constancia, M. and Ozanne, S. E. (2011). Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the *Hnf4a* gene in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, (13). 5449-54.
- Sayer, A. A., Syddall, H. E., Gilbody, H. J., Dennison, E. M. and Cooper, C. (2004). Does sarcopenia originate in early life? Findings from the Hertfordshire cohort study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 59, (9). M930-4.
- Schenk, S., Saberi, M. and Olefsky, J. M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 118, (9). 2992-3002.
- Schirch, V. and Strong, W. B. (1989). Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 269, (2). 371-80.
- Schwartz, M. W., Baskin, D. G., Bukowski, T. R., Kuijper, J. L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D. E., Porte, D., Jr., Woods, S. C., Seeley, R. J. and Weigle, D. S. (1996). Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in *ob/ob* mice. *Diabetes*. 45, (4). 531-5.
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P. and Baskin, D. G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*. 46, (12). 2119-23.
- Selhub, J. (1999). Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 19, 217-46.

- Selhub, J., Seyoum, E., Pomfret, E. A. and Zeisel, S. H. (1991). Effects of choline deficiency and methotrexate treatment upon liver folate content and distribution. *Cancer Res.* 51, (1). 16-21.
- Shaw, G. M., Carmichael, S. L., Laurent, C. and Rasmussen, S. A. (2006). Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 17, (3). 285-91.
- Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., Imielinska, C., Ross, R. and Heymsfield, S. B. (2003). Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res.* 11, (1). 5-16.
- Silander, K., Mohlke, K. L., Scott, L. J., Peck, E. C., Hollstein, P., Skol, A. D., Jackson, A. U., Deloukas, P., Hunt, S., Stavrides, G., Chines, P. S., Erdos, M. R., Narisu, N., Conneely, K. N., Li, C., Fingerlin, T. E., Dhanjal, S. K., Valle, T. T., Bergman, R. N., Tuomilehto, J., Watanabe, R. M., Boehnke, M. and Collins, F. S. (2004). Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes.* 53, (4). 1141-9.
- Sinclair, K. D., Allegrucci, C., Singh, R., Gardner, D. S., Sebastian, S., Bispham, J., Thurston, A., Huntley, J. F., Rees, W. D., Maloney, C. A., Lea, R. G., Craigon, J., Mcevoy, T. G. and Young, L. E. (2007). DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, (49). 19351-6.
- Singhal, A., Wells, J., Cole, T. J., Fewtrell, M. and Lucas, A. (2003). Programming of lean body mass: a link between birth weight, obesity, and cardiovascular disease? *Am J Clin Nutr.* 77, (3). 726-30.
- Smallwood, S. A. and Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet.* 28, (1). 33-42.
- Smith, F. M., Garfield, A. S. and Ward, A. (2006). Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenet Genome Res.* 113, (1-4). 279-91.
- Smithells, R. W., Sheppard, S. and Schorah, C. J. (1976). Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child.* 51, (12). 944-50.
- Smith-Kirwin, S. M., O'connor, D. M., De Johnston, J., Lancey, E. D., Hassink, S. G. and Funanage, V. L. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, (5). 1810-3.

- Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B. and Hoet, J. J. (1990). Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate*. 57, (2). 107-18.
- Sole, M. J. and Jeejeebhoy, K. N. (2002). Conditioned nutritional requirements: therapeutic relevance to heart failure. *Herz*. 27, (2). 174-8.
- Souza-Mello, V., Mandarim-De-Lacerda, C. A. and Aguilu, M. B. (2007). Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. *Br J Nutr*. 98, (6). 1159-69.
- Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*. 87, (3). 377-89.
- Stoffers, D. A., Desai, B. M., Deleon, D. D. and Simmons, R. A. (2003). Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetes*. 52, (3). 734-40.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403, (6765). 41-5.
- Surani, M. A. and Barton, S. C. (1983). Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science*. 222, (4627). 1034-6.
- Surani, M. A., Barton, S. C. and Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 308, (5959). 548-50.
- Tamaru, H. and Selker, E. U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*. 414, (6861). 277-83.
- Tang, Q., Wu, W., Xu, X., Huang, L., Gao, Q., Chen, H., Sun, H., Xia, Y., Sha, J., Wang, X., Chen, D. and Xu, Q. (2013). miR-141 contributes to fetal growth restriction by regulating PLAG1 expression. *PLoS One*. 8, (3). e58737.
- Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem*. 272, (10). 6093-6.
- Tian, X. and Diaz, F. J. (2013). Acute dietary zinc deficiency before conception compromises oocyte epigenetic programming and disrupts embryonic development. *Dev Biol*. 376, (1). 51-61.
- Tobi, E. W., Lumey, L. H., Talens, R. P., Kremer, D., Putter, H., Stein, A. D., Slagboom, P. E. and Heijmans, B. T. (2009). DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet*. 18, (21). 4046-53.

- Toperoff, G., Aran, D., Kark, J. D., Rosenberg, M., Dubnikov, T., Nissan, B., Wainstein, J., Friedlander, Y., Levy-Lahad, E., Glaser, B. and Hellman, A. (2012). Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet.* 21, (2). 371-83.
- Torrens, C., Brawley, L., Anthony, F. W., Dance, C. S., Dunn, R., Jackson, A. A., Poston, L. and Hanson, M. A. (2006). Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. *Hypertension.* 47, (5). 982-7.
- Tremolizzo, L., Carboni, G., Ruzicka, W. B., Mitchell, C. P., Sugaya, I., Tueting, P., Sharma, R., Grayson, D. R., Costa, E. and Guidotti, A. (2002). An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, (26). 17095-100.
- Uriu-Adams, J. Y. and Keen, C. L. (2010). Zinc and reproduction: effects of zinc deficiency on prenatal and early postnatal development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 89, (4). 313-25.
- Varrault, A., Gueydan, C., Delalbre, A., Bellmann, A., Houssami, S., Aknin, C., Severac, D., Chotard, L., Kahli, M., Le Digarcher, A., Pavlidis, P. and Journot, L. (2006). *Zac1* regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell.* 11, (5). 711-22.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., Mckusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W.,

Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., Mccawley, S., Mcintosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., Mcdaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. and Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*. 291, (5507). 1304-51.

- Vickers, M. H., Breier, B. H., Mccarthy, D. and Gluckman, P. D. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285, (1). R271-3.
- Villena, J. A., Kim, K. H. and Sul, H. S. (2002). Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm Metab Res*. 34, (11-12). 664-70.

- Vineis, P., Chuang, S. C., Vaissiere, T., Cuenin, C., Ricceri, F., Johansson, M., Ueland, P., Brennan, P. and Herceg, Z. (2011). DNA methylation changes associated with cancer risk factors and blood levels of vitamin metabolites in a prospective study. *Epigenetics*. 6, (2). 195-201.
- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol*. 41, (1). 10-3.
- Waterland, R. A. (2003). Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *J Nutr*. 133, (1). 238; author reply 239.
- Waterland, R. A., Jirtle, R. L. (2004) Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nut*. 20(1):63-8.
- Waterland, R. A. (2009). Is epigenetics an important link between early life events and adult disease? *Horm Res*. 71 Suppl 1, 13-6.
- Waterland, R. A., Dolinoy, D. C., Lin, J. R., Smith, C. A., Shi, X. and Tahiliani, K. G. (2006). Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis*. 44, (9). 401-6.
- Waterland, R. A. and Garza, C. (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 69, (2). 179-97.
- Waterland, R. A. and Garza, C. (2002). Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *J Nutr*. 132, (3). 357-64.
- Waterland, R. A., Travisano, M., Tahiliani, K. G., Rached, M. T. and Mirza, S. (2008). Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 32, (9). 1373-9.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. and Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*. 7, (8). 847-54.
- Wigmore, P. M. and Dunglison, G. F. (1998). The generation of fiber diversity during myogenesis. *Int J Dev Biol*. 42, (2). 117-25.
- Williams, L. J., Mai, C. T., Edmonds, L. D., Shaw, G. M., Kirby, R. S., Hobbs, C. A., Sever, L. E., Miller, L. A., Meaney, F. J. and Levitt, M. (2002). Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology*. 66, (1). 33-9.

- Wilson, S. J., Ross, J. J. and Harris, A. J. (1988). A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development*. 102, (4). 815-21.
- Wlodek, M. E., Westcott, K., Siebel, A. L., Owens, J. A. and Moritz, K. M. (2008). Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. *Kidney Int.* 74, (2). 187-95.
- Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R. and Cooney, C. A. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J.* 12, (11). 949-57.
- Woodall, S. M., Johnston, B. M., Breier, B. H. and Gluckman, P. D. (1996). Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res.* 40, (3). 438-43.
- Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D. and Porte, D., Jr. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*. 282, (5738). 503-5.
- Yajnik, C. S. (2002). The lifecycle effects of nutrition and body size on adult adiposity, diabetes and cardiovascular disease. *Obes Rev.* 3, (3). 217-24.
- Yang, M, Yang L, Qi L, Guo Y, Lin X, Zhang Y, Du Y. (2013). Association between the methionine synthase A2756G polymorphism and neural tube defect risk: a meta-analysis. *Gene*. 520(1):7-13.
- Zambrano, E., Bautista, C. J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P. M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F. and Nathanielsz, P. W. (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol.* 571, (Pt 1). 221-30.
- Zamudio, N. M., Chong, S. and O'bryan, M. K. (2008). Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction*. 136, (2). 131-46.
- Zeisel, S. H. (2006). Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr.* 26, 229-50.
- Zeisel, S. H. and Blusztajn, J. K. (1994). Choline and human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 14, 269-96.

- Zeisel, S. H., Da Costa, K. A., Franklin, P. D., Alexander, E. A., Lamont, J. T., Sheard, N. F. and Beiser, A. (1991). Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J.* 5, (7). 2093-8.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372, (6505). 425-32.
- Zhu, M. J., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W. and Du, M. (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol Reprod.* 71, (6). 1968-73.
- Zimmet, P., Hodge, A., Nicolson, M., Staten, M., De Courten, M., Moore, J., Morawiecki, A., Lubina, J., Collier, G., Alberti, G. and Dowse, G. (1996). Serum leptin concentration, obesity, and insulin resistance in Western Samoans: cross sectional study. *BMJ.* 313, (7063). 965-9.

Impact d'une supplémentation périnatale en donneurs de méthyl sur les mécanismes physiologiques et épigénétiques de la programmation nutritionnelle chez le rat

Des études épidémiologiques et expérimentales montrent que l'alimentation maternelle pendant la période périnatale a une influence sur le développement fœtal et sur la susceptibilité à développer des maladies à l'âge adulte. Cette théorie, connue sous le nom « d'empreinte nutritionnelle » serait sous-tendue notamment par des mécanismes épigénétiques qui agiraient sur la régulation de l'expression du génome. Les composés de la voie des folates sont essentiels pour le développement fœtal. Ils agissent entre autres en tant que donneurs de groupements méthyls et sont donc très impliqués dans les mécanismes épigénétiques. Afin d'étudier leurs effets sur les mécanismes de l'empreinte nutritionnelle, une supplémentation a été réalisée dans un contexte de restriction protéique maternelle. L'objectif de ce projet était d'observer l'influence de la méthylation de l'ADN sur la croissance fœtale et le métabolisme énergétique et d'identifier des gènes ou régions du génome dont le niveau de méthylation serait affecté par la nutrition maternelle en période périnatale. Nous avons mis en évidence un impact de cette supplémentation sur les taux de leptine, une hormone très impliquée dans les processus physiologiques de programmation nutritionnelle. Nous avons pu observer une variation d'expression d'une catégorie de gènes spécifiques : les gènes soumis à l'empreinte génomique parentale, et notamment les gènes *Igf2* et *H19* connus pour être impliqués dans la croissance fœtale. Nous avons pu mettre en évidence des variations des profils de méthylation de ces gènes. Une étude globale sans a priori de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome entier permettra d'élargir cette analyse.

Mots clés : Programmation nutritionnelle, donneurs de méthyl, méthylation de l'ADN, épigénétique, métabolisme.

Impact of perinatal methyl donor supplementation on physiological and epigenetics mechanisms of the rat nutritional programming

Epidemiological and experimental studies have shown that perinatal nutrition may impact fetal development and susceptibility to develop metabolic disorders at adulthood. This theory was named "nutritional imprinting" and may involve gene expression modifications via epigenetic mechanisms. Nutrients involved in the folic acid metabolic pathway are essential for fetal development. They serve in particular as methyl group donors and are therefore strongly involved in epigenetic mechanisms. In order to study their effects on nutritional imprinting mechanisms, we combined a maternal supplementation in methyl donors with a protein restriction and we studied the consequences on the offspring. The aim of this project was to assess the influence of DNA methylation on fetal growth and early programming of energy metabolism and to identify genes or genomic regions where DNA methylation level will be affected by perinatal maternal diet. We showed evidence of an impact of this supplementation on leptin levels, a hormone widely involved in physiological processes of nutritional programming. We observed changes in the expression levels of a special class of genes: imprinted genes, and particularly *Igf2* and *H19* genes, which are well known to be involved in fetal growth. We showed that DNA methylation profiles of these genes were affected by maternal nutrition. A genome wide DNA methylation study was undergone in order to get a larger view of the maternal diet impact on epigenetic regulation of the offspring genome.

Key words: nutritional programming, methyl donors, DNA methylation, epigenetic, metabolism