

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

									3	0
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

Étude du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique chez le rat dans un modèle de programmation métabolique

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Physiologie, Nutrition et Métabolisme

Présentée

et soutenue publiquement par

Aurore MARTIN AGNOUX

Le 18 octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Président Pr Khadija Ouguerram, PU, Inserm 1087/CNRS 6291, Nantes

Rapporteurs Pr Latifa Abdennebi Najar, PU, Institut Polytechnique de La Salle, Beauvais
Dr Daniel Zalko, DR, INRA 1331 Toxalim, Toulouse

Examineur Pr Jean-François Huneau, PU, INRA/AgroParisTech 914, Paris

Directeur de thèse Dr Patricia Parnet, DR, INRA 1280 PHAN, Nantes

Co-directeur de thèse Dr Jean-Philippe Antignac, IR, Oniris/INRA 1329 LABERCA, Nantes

Membres invités Dr Clothilde Des Robert, PH au CHU de Marseille

Dr Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, IR, INRA 1280 PHAN, Nantes

« Ce qui te manque, cherche le dans ce que tu as »,
Koan Zen

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Khadija Ouguerram, le Docteur Daniel Zalko, le Professeur Latifa Abdennebi-Najar, le Professeur Jean-François Huneau – qui le premier m’a initié à la recherche fondamentale en Nutrition Humaine et m’avez communiqué le plaisir d’explorer le métabolisme – et le Docteur Chlothilde Des Robert, de me faire l’honneur de constituer le jury de cette thèse et d’en évaluer son travail.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements au Professeur Dominique Darmaun de m’avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci également pour votre expertise précieuse dans l’écriture des papiers et pour le temps que vous m’avez accordé. Votre enseignement fut très formateur.

Merci au Docteur Patricia Parnet, au Docteur Jean-Philippe Antignac et au Docteur Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, encadrants de cette thèse. Une expérience très riche tant au niveau professionnel que humain. Un sujet d’actualité qui m’aura passionné. Merci de m’avoir ouverte au monde de la métabolomique et du temps que vous m’avez consacré.

Je voudrais remercier chaleureusement le Professeur Pierre Asfar et le Docteur Cécile Durant pour leurs précieux conseils, leur aide et leurs encouragements face à mes choix professionnels.

Merci à l’équipe Ponan et particulièrement à Jean-Claude, Camille et Christina. Cela a été un réel plaisir de réaliser ces missions ensemble, qui m’ont permis de découvrir d’autres domaines.

Je souhaite également remercier l’ensemble des personnes extérieures au laboratoire avec qui j’ai été amenée à travailler au cours de cette thèse et dont les échanges ont été très enrichissants : le Professeur Paul Pévet et le Docteur Mireille Masson-Pévet, le Docteur Gilles Simard, les Docteurs Muhammad-Quaid Zaman et Véronique Leray, le Docteur Anne Meynier, le Docteur Frédérique Courant et Anne-Lise Royer.

Merci à l’ensemble des personnes qui participent à donner vie au laboratoire, à ceux avec qui j’ai partagé le même bureau ainsi qu’à tous ceux avec qui les échanges de sourires auront agrémenté le quotidien.

Merci aux animaliers, particulièrement Guillaume et Isabelle, sans votre aide la réalisation de ce protocole n’aurait pas été ce qu’elle a été.

Je tiens à exprimer toute mon amitié à Omar, Nicolas, Renata, Raquel, Aurélie, Evelyne et Gwenola.

Merci à ma famille et aux amis pour tous ces excellents moments partagés qui n’ont pas de prix.

À vous trois qui comptez tellement pour moi, mes parents et mon frère, Jérôme. Merci de m’apporter tant de bonheur.

Publications :

Relative contribution of fetal and postnatal nutritional periods on feeding regulation in adult rats

Martin Agnoux A, Alexandre-Gouabau MC, Le Dréan G, Antignac JP, Parnet P
Acta Physiologica, 2013

Use of UPLC-ESI-MS/MS to quantitate free amino acid concentrations in micro-samples of mammalian milk

Ferchaud-Roucher V, Desnots E, Naël C, Martin Agnoux A, Alexandre-Gouabau MC, Darmaun D, Boquien CY
Amino Acids Collection, 2013

Publications (en soumission) :

Time-window dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in male offspring exposed to Western diet in adulthood

Martin Agnoux A., Antignac J.-P., Simard G., Poupeau G., Darmaun D., Parnet P., Alexandre-Gouabau M.-C.
Soumis à Diabetes

Perinatal maternal protein restriction modulates milk composition and impacts short-term offspring growth

Martin Agnoux A., Antignac J.-P., Boquien C.Y., David A., Desnots E., Ferchaud-Roucher V., Parnet P., Alexandre-Gouabau M.-C.
Soumis à British Journal of Nutrition

Communications orales :

Martin Agnoux A « **Influence de l'environnement nutritionnel précoce sur le comportement alimentaire et l'insulino-résistance** », invitée aux IVème journées Ponan : « Alimentation : risques et bénéfices », Nantes, Octobre 2012

Martin Agnoux A, Alexandre-Gouabau MC, Le Dréan G, Moyon T, Poupeau G, Boquien CY, Antignac JP, Parnet P. « **Maternal perinatal protein restriction affects male offspring**

growth and feeding behaviour », International Conference on Nutrition & Growth, Paris, Mars 2012

Martin Agnoux A, Antignac JP, Parnet P, Alexandre-Gouabau MC « **Impact de la nutrition périnatale sur le métabolisme de la descendance dans un modèle de programmation** »
6^{ième} Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Nantes, Mai 2012

Martin Agnoux A « **Conséquences de la nutrition périnatale sur le métabolisme de la descendance** », invitée aux 5^{ième} journées scientifiques de Nantes, colloque de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, Juin 2012

Martin Agnoux A « **Et si notre comportement alimentaire et notre composition corporelle étaient programmés dès le plus jeune âge...** », invitée au Colloque Ponan : « Alimentation : Quelles réponses face à des besoins spécifiques : enfant, senior, population obèse ? », Angers, Novembre 2012

Martin Agnoux A « **Effets de la malnutrition périnatale sur la prise alimentaire adulte** », invitée à la Semaine du cerveau, Nantes, Mars 2012

Communication par affiche :

Le Dréan G, Martin Agnoux A, Haure-Mirande V, Coupé B, Parnet P, Alexandre-Gouabau MC, Seguin JP (poster 91) « **Gastro-intestinal peptides and first meal pattern following energy restriction in a rat model of intra-uterine growth restriction** », International Conference on Nutrition & Growth, Paris, Mars 2012

Martin Agnoux A, Antignac JP, David A, Desnots E, Ferchaud-Roucher V, Boquien CY, Parnet P, Alexandre-Gouabau MC (poster 49) « **Une restriction protéique périnatale module la composition du lait maternel et le métabolisme de la descendance chez un modèle rongeur de programmation nutritionnelle** », Journées Francophones de Nutrition, Lyon, Décembre 2012

Liste des abréviations

AA	: Acide aminé
ACC	: Acétyl-coA carboxylase
AGNE	: Acide gras non estérifié
AgRP	: Agouti-Related Protein
AMP	: Adenosine monophosphate
AMPK	: AMP-activated protein kinase
ARC	: Noyau Arqué de l'hypothalamus
ATP	: Adenosine Triphosphate
BCAA	: Acide aminé à chaîne branchée
BHE	: Barrière Hémato-Encéphalique
CART	: Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript
Co-A	: Coenzyme-A
CPT-I	: Carnitine palmitoyltransferase-I
ChREBP	: Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein
CRH	: Corticotropin-Releasing Hormone
DMN	: Noyau hypothalamique Dorsomedian
DOHaD	: Developmental Origin of Health and Disease
DT2M	: Diabète de type 2 mellitus
EPA	: Acide eicosapentaénoïque
FAA	: Free amino acid
FAD/FADH ₂	: Flavine adenine dinucleotide/ Flavine adenine dinucleotide hydroquinone
FAS	: Fatty Acid Synthase
FOXO-1	: Forkhead box protein O-1
GLUT	: Transporteur de glucose
HDL	: High density lipoprotein
HSL	: Hormone-sensitive lipase
IMC	: Indice de Masse corporelle
IR	: Insulin receptor
IRS	: Insulin receptor substrate
JAK/STAT3	: Janus kinase/ signal transduction and activators of transcription 3
LHA	: Aire latérale de l'hypothalamus
MCH	: Melanin-Concentrating Hormone
MCT	: Transporteur de Monocarboxylate

MAP : Mitogen-activated protein
 α -MSH : Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone
NAD⁺ : Nicotinamide Adenine Nucleotide (forme oxydée)
NADH : Nicotinamide Adenine Nucleotide (forme réduite)
NPY : Neuropeptide Y
NTS : Noyau du Tractus Solitaire
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PI3 kinase : Phosphatidylinositol-3 kinase
PFK-1 : 6-Phosphofructo-1-kinase
PDK : Pyruvate déshydrogénase kinase
PDH : Pyruvate déshydrogénase
PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
PLS : Partial least square
POMC : Pro-opiomélanocortine
PVN : Noyau hypothalamique paraventriculaire
RCIU : Retard de croissance intra-utérin
SMet : Syndrome Métabolique
SREBP1c : Sterol Response-Elements Binding Proteins-1c
SOCS3 : Suppressor of cytokine signalling-3
TCA : Cycle Tricarboxylique
TG : Triglycérides
TRH : Thyrotropin-Releasing Hormone
VMN : Noyau hypothalamique ventromédian
SNC : Système Nerveux Central

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Répartition de la population française en fonction du niveau d'indice de masse corporelle.

Figure 2. Courbe de croissance fœtale et infantile.

Figure 3. Schéma des adaptations structurelles et moléculaires des tissus au cours de la programmation intra-utérine des maladies métaboliques.

Figure 4. Modèle rongeur utilisé dans l'étude de la programmation métabolique de la descendance par exposition des mères à un régime normoprotéique ou restreint en protéines pendant les périodes pré- et postnatale.

Figure 5. Facteurs endogènes et exogènes influençant le contrôle de la prise alimentaire et de l'équilibre énergétique.

Figure 6. Circuits peptidiques de l'hypothalamus impliqués dans le comportement alimentaire et la balance énergétique.

Figure 7. Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones du noyau arqué en réponse à l'intégration des signaux nerveux et hormonaux délivrés par les tissus périphériques.

Figure 8. Représentation schématique potentielle expliquant le mécanisme selon lequel l'oxydation des acides gras dans les entérocytes pourrait influencer la prise alimentaire

Figure 9. Évidences du rôle neurotrophique de la leptine au niveau hypothalamique en période périnatale.

Figure 10. Voie de signalisation de la leptine et de l'insuline dans le noyau arqué.

Figure 11. Schéma des grandes étapes du métabolisme catabolique.

Figure 12. Schéma général du métabolisme du glucose.

Figure 13. Représentation schématique du métabolisme catabolique des acides aminés protéinogéniques.

Figure 14. Flux généraux intra-cellulaire des acyl-CoA.

Figure 15. Représentation schématique des rôles distincts joués par l'acetyl-coenzyme A carboxylase 1 (ACC1) et l'acetyl-coenzyme A carboxylase 2 (ACC2) dans le métabolisme des lipides dans les tissus des mammifères.

Figure 16. Les voies de transduction induites dans la signalisation de l'insuline.

Figure 17. Modèle illustrant le paradoxe selon lequel l'insulino-résistance hépatique produit des désordres métaboliques plus sévères qu'une insulino-résistance globale.

Figure 18. Modification de la trajectoire métabolique de la descendance au cours de la programmation métabolique et stratification des phénotypes associés.

Figure 19. Schéma bilan des principales observations extraites de l'étude 1 sur le comportement alimentaire de rats adultes mâles ayant eu une modification de leur trajectoire de croissance pré- et/ou postnatale par modulation de l'apport protéique maternelle en période périnatale.

Figure 20. Schéma bilan des observations extraites de l'étude 2 et propositions sur les altérations du métabolisme énergétique de rats adultes mâles ayant eu une modification de trajectoire de croissance pré- et/ou postnatale par modulation de l'apport protéique maternelle en période périnatale.

Figure 21. Schéma bilan des principales observations extraites de l'étude 3 sur la composition du lait suite à l'exposition des rates à une restriction protéique pendant les périodes de gestation et de lactation.

Tableau 1. Critères retenus dans les définitions les plus récentes du syndrome métabolique selon le National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III, 2001) et l'international Diabetes Federation (IDF, 2005).

Table des matières

Remerciements.....	5
Publications et communications	6
Liste des abréviations.....	8
Liste des figures et tableaux	10
Table des matières	12

Introduction générale 15

Chapitre 1 : Syndrome métabolique et programmation métabolique : rôle de la nutrition périnatale 17

1. Syndrome métabolique et programmation métabolique.....	19
1.1 Définition et facteurs de risques du syndrome métabolique	19
1.2 Le concept de programmation métabolique.....	21
1.3 Les modèles et mécanismes généraux de la programmation métabolique	23
2. Le comportement alimentaire et sa programmation par la nutrition périnatale	29
2.1 La prise alimentaire, une régulation centrale	29
2.2 La prise alimentaire, une régulation périphérique	33
2.3 Les évidences de la programmation du comportement alimentaire, un lien vers le développement de l'obésité ?	39
3. Le métabolisme énergétique et sa programmation par la nutrition périnatale.....	43
3.1 Les grandes étapes du métabolisme énergétique et ses facteurs de régulation	45
3.2 L'insulino-résistance et ses mécanismes	53
3.3 Les évidences de la programmation du métabolisme énergétique. Quelles relations avec le diabète de type 2 ?	59

Conclusion de l'étude bibliographique et objectifs de la thèse 63

Chapitre 2 : Résultats de la modulation de la nutrition périnatale sur la prise alimentaire et le métabolisme énergétique à l'âge adulte 69

Introduction et résultats marquants	71
Article 1: Relative contribution of fetal and postnatal nutritional periods on feeding regulation in adult rats	77
Introduction et résultats marquants	95
Article 2: Time-window dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in male offspring exposed to Western diet in adulthood	101

Discussion et perspectives sur les conséquences de la programmation du comportement alimentaire et du métabolisme à long terme 130

1. Une programmation du comportement alimentaire propre aux trajectoires de croissance pré- et postnatale	130
2. L'empreinte nutritionnelle périnatale pourrait déterminer l'insulino-sensibilité périphérique par la programmation du métabolisme énergétique	134
3. Nos perspectives de travail à l'issue de ces résultats	138

Chapitre 3 : Résultats du régime maternel en période périnatale sur la composition du lait et le métabolisme précoce de la descendance 139

Introduction et résultats marquants	141
Article 3: Perinatal maternal protein restriction modulates milk composition and impacts short-term offspring growth	146
Perspectives	175

Conclusion générale 180

Références bibliographiques	182
Annexe	210
Annexe 1- Liste des métabolites annotés au niveau plasmatique dans l'étude 4 sur des ratons de 16 jours soumis à une empreinte métabolique nutritionnelle périnatale	210
Annexe 2- Article 5: Use of UPLC-ESI-MS/MS to Quantitate Free Amino Acid Concentrations in Micro-samples of Mammalian Milk	213

Introduction générale

Le syndrome métabolique est un ensemble de signes cliniques et de symptômes associés à de nombreuses pathologies telles que l'obésité, le diabète de type 2, l'athérosclérose, la dyslipidémie ou encore l'hypertension. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 atteignent aujourd'hui des proportions pandémiques. Ces pathologies représentent un problème de santé publique majeur du fait qu'elles accroissent chez l'adulte le risque de maladies cardiovasculaires et de plusieurs types de cancer. De plus, autrefois considérée comme étant spécifique aux adultes des pays développés, l'obésité s'étend aujourd'hui de plus en plus aux pays de faible ou moyen revenus, et gagne progressivement et de façon inquiétante les enfants (WHO, 2012).

L'obésité ainsi que le diabète de type 2 sont des pathologies multifactorielles dans lesquelles les facteurs environnementaux, biologiques et génétiques peuvent exercer un rôle plus ou moins important dans leur développement. De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence que les enfants nés avec un petit poids de naissance, induit par un retard de croissance intra-utérin (RCIU), présentent un risque plus important de développer des maladies cardio-métaboliques à l'âge adulte. Ces observations ont fait émerger le concept de programmation métabolique connu sous le nom de DOHaD « Developmental Origins of Health and Disease ». Ce concept défend l'hypothèse que l'environnement précoce, dont en particulier sa composante nutritionnelle, lors de fenêtres de temps critiques sur le plan du développement périnatal, pourrait avoir des répercussions pérennes sur le métabolisme de l'adulte. Ainsi, les travaux scientifiques portant sur les événements nutritionnels précoces et leurs conséquences métaboliques visent à comprendre les mécanismes de la mise en place de l'obésité, du diabète de type 2 et des désordres métaboliques associés et représentent donc des enjeux majeurs en santé publique. C'est dans cette problématique générale que s'est inscrite cette étude.

Dans ce travail de thèse, nous avons posé comme objectifs d'évaluer l'impact de la nutrition périnatale sur le comportement alimentaire à l'âge adulte et l'évolution du métabolisme énergétique de la naissance à l'âge adulte afin de considérer plus précisément le rôle de chacune de ces deux composantes dans l'apparition à long terme de dérégulations métaboliques. Pour répondre à ces objectifs, cette étude a été réalisée sur un modèle rongeur

de programmation métabolique induit par restriction de l'apport protéique maternel en période périnatale, dont la descendance a été exposée à l'âge adulte à un régime de type Occidental. Au plan méthodologique, ce travail a reposé sur l'intégration d'approches ciblées (comportementales, fonctionnelles et biologiques) et non ciblées (phénotypage métabolomique). D'autre part, nous avons étudié finement la composition du lait des rates afin d'évaluer l'impact du régime hypoprotidique imposé aux mères sur la qualité de leur lait et les effets que pourraient exercer le lait sur la signature métabolique précoce de la descendance.

Dans un premier temps, et après un rapide état des lieux du contexte épidémiologique concernant le syndrome métabolique et ses facteurs de risque, ce manuscrit présentera une synthèse bibliographique relative à l'état des connaissances scientifiques actuelles sur le concept de programmation métabolique et ses modèles expérimentaux. Ce premier volet s'intéressera ensuite plus particulièrement à la régulation du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique de façon générale, puis dans un contexte de programmation métabolique induite par manipulation du régime alimentaire maternel en période périnatale. Dans un second temps, les résultats découlant de nos travaux de recherche menés à la fois par des approches ciblées et sous un angle plus intégratif seront présentés et discutés, ceci au travers des 4 articles (finalisés ou en cours de préparation) issus de ces travaux.

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire de Physiologie des Adaptations Nutritionnelles (UMR INRA 1280 PHAN, Nantes), en collaboration avec le Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (USC INRA 1329 LABERCA) de l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (Oniris, Nantes) pour ce qui concerne les aspects de phénotypage métabolomique. Ce travail a bénéficié d'une allocation de thèse financée par le Pôle Nantais Alimentation et Nutrition (PONAN).

Chapitre 1 :

Syndrome métabolique et programmation métabolique : rôle de la nutrition périnatale

Tableau 1. Critères retenus dans les définitions les plus récentes du syndrome métabolique selon le National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III, 2001) et l'International Diabetes Federation (IDF, 2005) (Lameira et al, 2008).

Critère	NCEP-ATP III 2001	IDF 2005
Tour de taille	> 88 (F) ou 102 cm (H)	> 80 (F) ou 94 cm (H) (*)
Pression artérielle	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg
Glycémie à jeun	> 110 mg/dL (**)	> 100 mg/dL
Triglycérides	> 150 mg/dL	> 150 mg/dL
Cholestérol HDL	< 50 (F) ou 40 (H) mg/dL	< 50 (F) ou 40 (H) mg/dL

(*) Présence obligatoire dans la définition de l'IDF, mais seuil variable selon l'ethnie considérée

(**) Valeur seuil abaissée à 100 mg/dL dans la version remaniée retenue en 2005

H : Homme; F : Femme

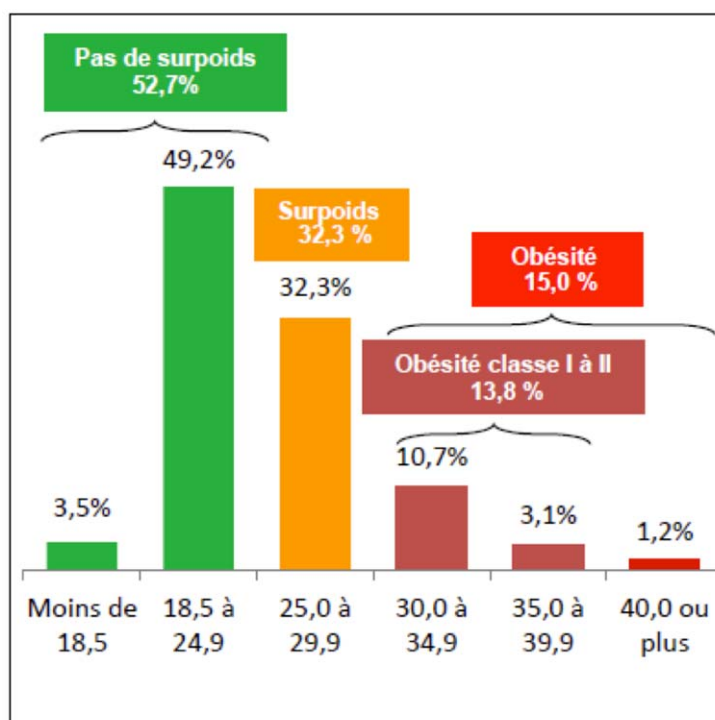


Figure 1. Répartition de la population française en fonction du niveau d'indice de masse corporelle (Obépi, 2012).

En 2012, 32,3% des hommes et des femmes français adultes de plus de 18 ans sont en surpoids et 15% sont obèses.

1. Syndrome métabolique et programmation métabolique

1.1 Définition et facteurs de risques du syndrome métabolique

Les définitions sur le syndrome métabolique (SMet) diffèrent selon les organismes de santé et les pays. Un consensus existe toutefois entre l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé, 1998), l'EGIR (European Group for the study of Insulin Resistance, 1999), le NCEP-ATP III (National Cholesterol Education/Program-Adult, 2001 et 2005) et l'IDF (International Diabetes Federation, 2005) qui caractérisent le SMet par l'association d'au moins 3 désordres métaboliques asymptomatiques présents chez un individu, parmi lesquels (Tableau 1) :

- un excès de poids et notamment un embonpoint abdominal (tour de taille supérieur à 102 cm pour les hommes et à 88 cm pour les femmes),
- une hypertension,
- une hyperglycémie supérieure ou égale à 6,1 mmol/L à jeun,
- un taux d'insuline anormalement élevé,
- une hyperlipidémie avec des taux sanguins de triglycérides supérieurs à 1,6 ou 1,7 mmol/L,
- une hypercholestérolémie avec des taux de cholestérol HDL (High density lipoprotein) inférieurs à 1,04 mmol/L pour les hommes et 1,29 mmol/L pour les femmes.

La prévalence du SMet varie selon la zone géographique, l'ethnie, la culture, le genre, les catégories socioprofessionnelles, l'activité physique et l'âge, mais également selon la définition retenue. D'après les études épidémiologiques, l'augmentation du SMet serait principalement due à une hausse de l'obésité et de la sédentarité. De ce fait, l'OMS place l'obésité en priorité en termes de prévention et de prise en charge. En 2005, 300 millions d'individus étaient obèses avec une incidence d'environ 15 à 30 % de la population dans les pays industrialisés. En 2008, à l'échelle mondiale, le surpoids (IMC : indice de masse corporelle compris entre 25 et 30 kg/m²) concerne 1,4 milliard de personnes de 20 ans et plus, soit 35% de la population, parmi lesquelles plus de 200 millions d'hommes et près de 300 millions de femmes sont obèses (IMC $\geq$ 30 kg/m²), soit 11% de la population. De façon encore plus préoccupante, le surpoids touche de plus en plus la population infantile et d'après les estimations de l'OMS, environ 40 millions d'enfants de moins de cinq ans présenteraient un surpoids en 2011. L'enquête épidémiologique ObÉpi (réalisée en France tous les 3 ans depuis 1997) recense 32.3% d'adultes français de 18 ans et plus en surpoids et 15% d'obèses

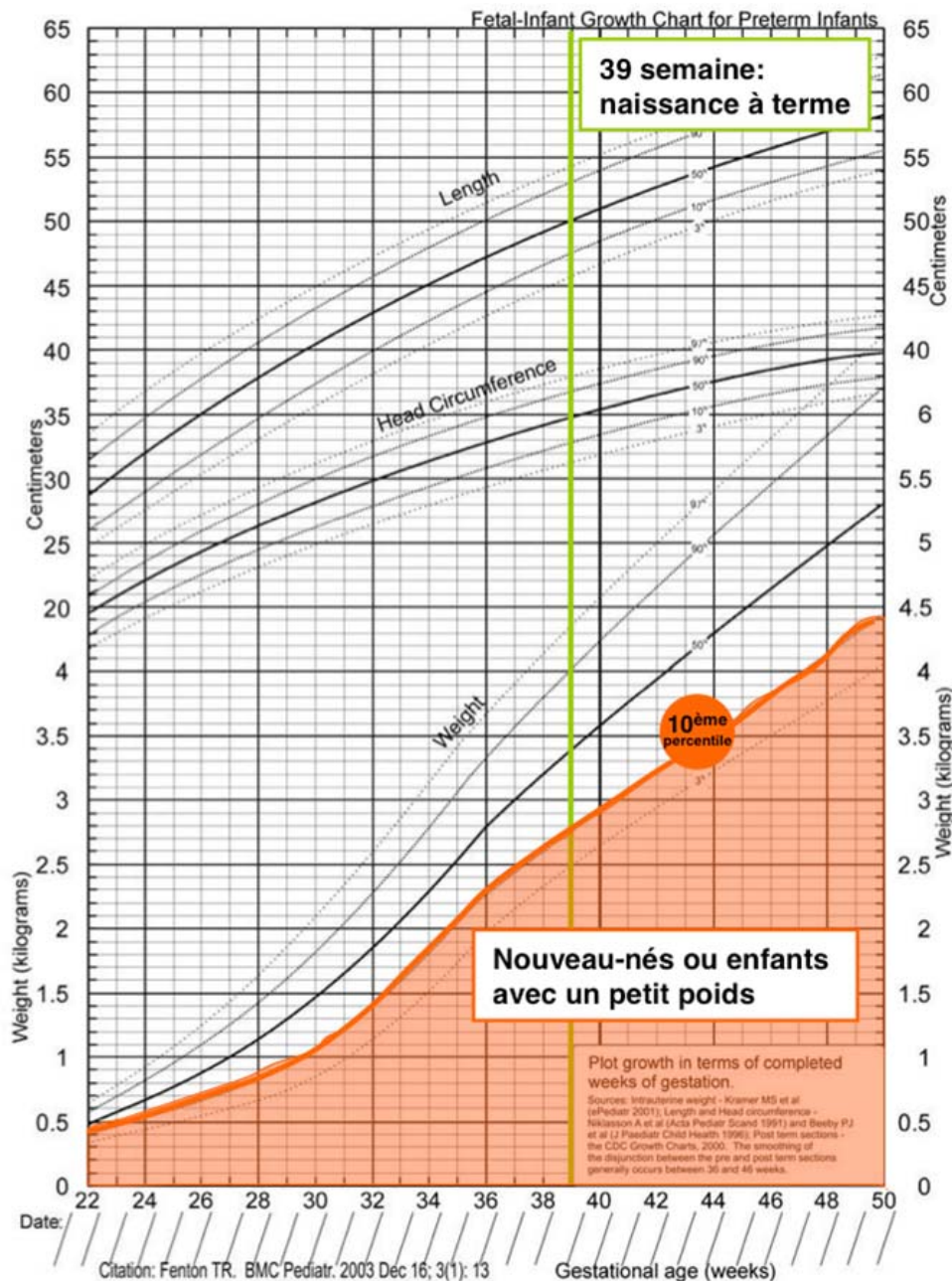


Figure 2. Courbe de croissance fœtale et infantile (modifiée à partir de Fenton, 2003).

Les enfants dont le poids de naissance se situe sous le 10^{ème} percentile sont considérés comme petits pour l'âge gestationnel d'après la méta-analyse de Fenton. Un petit poids de naissance résulte généralement d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Rosenberg, 2008). On distingue deux types de RCIU :

- le RCIU harmonieux qui se caractérise par une atteinte proportionnelle du poids, de la taille et du périmètre crânien. Il est le reflet d'une installation précoce de l'altération de la croissance fœtale et représenterait environ 30% des cas,
- le RCIU disharmonieux qui affecte préférentiellement la croissance pondérale, la croissance staturale et le périmètre crânien étant conservés. Ici, la réduction de la croissance interviendrait plus tardivement, principalement au cours du dernier trimestre et représenterait environ 70% des cas.

(Figure 1) (Obépi, 2012). En 15 ans (de 1997 à 2012), l'IMC moyen français est passé de 24,3 à 25,4 kg/m² ($p < 0,05$).

De nombreux facteurs de risque associés au SMet ont été identifiés notamment la sédentarité, certaines mutations génétiques, une faible activité physique, une exposition à certains composés chimiques de type perturbateurs endocriniens, ou encore un petit poids de naissance. Ce dernier présente une prévalence allant de 6% dans les régions de l'Asie de l'Est et du Pacifique, 7% dans les pays industrialisés (Europe et Amérique du Nord), 15% en Afrique Subsaharienne, 12% en Afrique du Nord et Moyen-Orient, 9% en Amérique du Sud à 27% dans le Sud de l'Asie. (UNICEF, 2009).

Les chercheurs font l'hypothèse que la manifestation du SMet et des troubles métaboliques associés répondraient à des mécanismes moléculaires et cellulaires communs indépendants de leur origine (Fernandez-twin & Ozanne, 2010).

1.2 Le concept de programmation métabolique

Dans les années 80 et 90 deux chercheurs anglais, C Nicholas Hales et David JP Barker, observent, à partir de données épidémiologiques locales, une corrélation inverse entre un poids de naissance faible et l'augmentation de la pression artérielle mesurée à l'âge adulte ou encore une tolérance au glucose réduite (Hales et al, 1991). Ces corrélations sont également observées sur une population d'adultes hollandais exposés *in utero* à la famine de 1944-1945 (Ravelli et al, 1999). Plus largement, les individus de petits poids de naissance, dont la cause principale est un retard de croissance intra-utérin (Rosenberg, 2008), présenteraient un risque 6 fois plus élevé que des individus nés de poids normal de développer un syndrome métabolique et 18 fois plus de risque de développer un diabète de type 2 à l'âge adulte (Hales & Barker, 1991; Rosenberg, 2008).

Un RCIU se caractérise par un poids de naissance inférieur au 10^{ème} percentile, une réduction du diamètre crânien et une petite taille (Figure 2). Les causes du RCIU sont cependant multiples et varient selon les pays. Tandis que dans les pays en voie de développement la malnutrition maternelle est le facteur prédominant quand au risque d'induire un RCIU chez le fœtus, dans les pays industrialisés, ce sont des déficiences au niveau placentaire (flux sanguin maternel et/ou fœtal inadéquat, transport de nutriments réduits, anomalies morphologiques du placenta, etc.) qui représentent le risque majeur de réduire la croissance fœtale (Sibley et al, 2005). Un diabète gestationnel, la consommation de

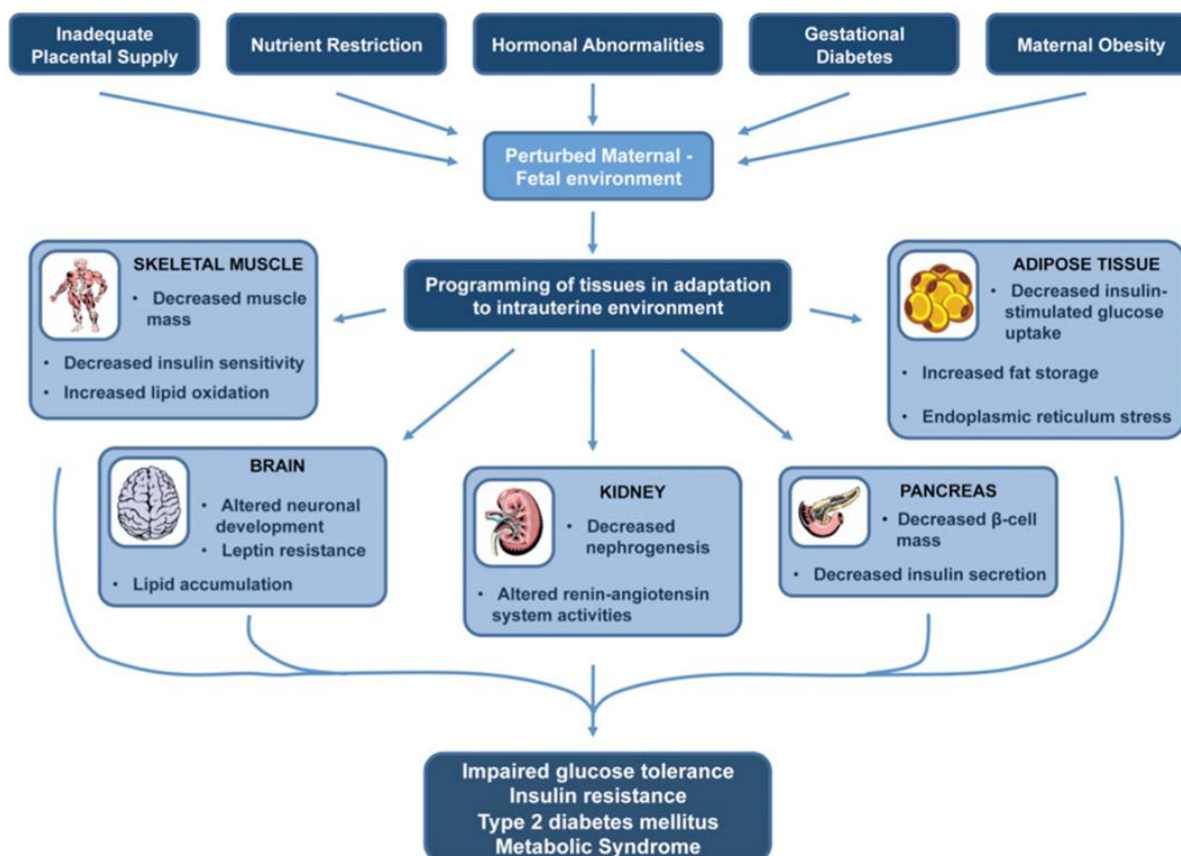


Figure 3. Schéma des adaptations structurales et métaboliques des tissus au cours de la programmation intra-utérine des maladies métaboliques (Warner & Ozanne, 2010).

Représentation schématique de résultats, issus de modèles animaux, sur les diverses adaptations structurales et fonctionnelles des tissus d'un individu suite à l'exposition prénatale à des perturbations physiologiques pouvant conduire sur le long terme au développement des différentes composantes du syndrome métabolique. D'après l'hypothèse du phénotype économe (Thrifty phenotype) décrit par Hales et Barker, le fœtus exposé à un environnement pauvre en nutriments serait sujet à des altérations structurales et fonctionnelles tissulaires au cours de leur développement, mais serait également programmé, en vue de favoriser sa survie, à stocker de l'énergie plutôt qu'à l'utiliser pour faire face à d'éventuelles nouvelles conditions de restriction énergétique (Barker et al, 1990). Cette adaptation se révèle délétère en cas d'exposition à un environnement nutritionnel postnatal adéquat ou pléthorique. La réponse physiologique mise en place pourrait entraîner l'apparition de troubles du métabolisme énergétique, ce qui prédisposerait le développement de maladies métaboliques chroniques.

produits nicotiniques, des perturbations hormonales peuvent également contribuer au RCIU.

Au regard de ces données, Hales et Barker proposèrent l'hypothèse du « Thrifty Phenotype » (phénotype économe) aujourd'hui connue sous le nom d'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD : Developmental Origin of Health and Disease) ou de programmation métabolique introduite par Waterland & Garza (Waterland & Garza, 1999). Ce concept défend l'hypothèse qu'en réponse à une nutrition fœtale et/ou postnatale appauvrie, le fœtus ou le nouveau né adopterait un nombre de stratégies pour augmenter ses chances de survies *in utero* et postnatale avec une allocation des nutriments en faveur de la croissance cérébrale au dépend d'autres tissus tels que le muscle, les reins et le pancréas endocrine (Figure 3). Cette altération de la distribution des nutriments, associée à un changement de la trajectoire de croissance, serait également accompagnée d'une modification de la trajectoire métabolique du nouveau né. Or les systèmes centraux et périphériques impliqués dans l'homéostasie énergétique étant sujets à une grande plasticité au cours de leur développement, c'est-à-dire en période périnatale, toute variation de l'environnement nutritionnel précoce pourrait avoir des répercussions pérennes sur la régulation des systèmes énergétiques. De plus, il est supposé que la programmation métabolique favoriserait la survie du nouveau né dans un environnement nutritionnel postnatal équivalent à celui auquel il aurait été exposé *in utero*. Ainsi, le phénotype économe programmé en période fœtale serait adapté à un environnement postnatal de même nature. Des apports caloriques trop importants au cours de la vie favoriseraient alors le stockage d'énergie et participeraient à l'installation progressive de maladies chroniques telles que le diabète de type 2, l'obésité etc. l'individu étant métaboliquement inadapté à un environnement nutritionnel pléthorique (Barker, 2004).

1.3 Les modèles et mécanismes généraux de la programmation métabolique

Les données épidémiologiques contemporaines ont permis d'avancer l'idée que l'environnement nutritionnel des 1000 premiers jours de vie, allant de la conception jusqu'aux 2 premières années de vie de l'enfant, serait déterminant pour la santé future de ce dernier (Nestlé Nutrition Institute, 2013). Ces études soulignent également que la fenêtre de développement, plutôt que le type d'alimentation parental (dénutrition ou surnutrition), prédominerait quant au risque de développer ultérieurement des maladies cardio-métaboliques (Ravelli et al, 1976; Phipps et al, 1993; van der Sande et al, 2001; Al-Almaie, 2005; Kim et al, 2005; Sanchez-Castillo et al, 2005; Plagemann et al, 1997; Whitaker 2004).

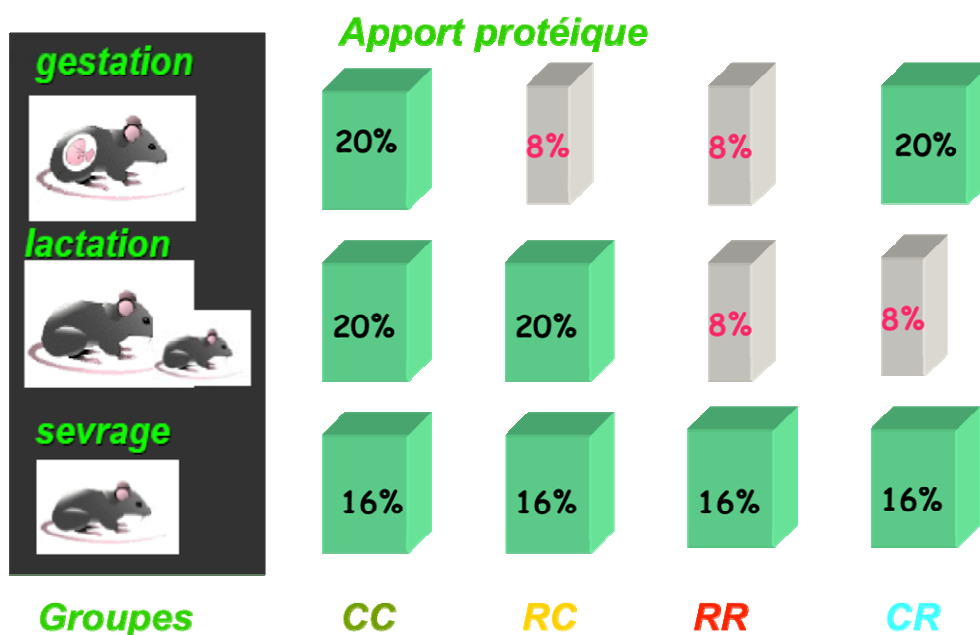


Figure 4. Modèle rongeur utilisé dans l'étude de la programmation métabolique de la descendance par exposition des mères à un régime normoprotéique ou restreint en protéines pendant les périodes pré- et postnatale.

Au cours de ce travail de thèse nous avons utilisé un modèle de programmation métabolique bien établi dans la littérature (Snøeck et al, 1990; Fonça-Berthon et al, 2009; Coupé et al, 2009). Après accouplement, des rates de souche Sprague Dawley reçoivent soit un régime alimentaire contenant 20% de protéines, soit un régime iso-calorique contenant 8% de protéines tout au long des phases de gestation et de lactation. À la naissance, les portées sont égalisées à 8 ratons mâles ou des deux sexes lorsque le nombre de mâles est insuffisant. Les ratons nés de mères restreintes en protéines (R) présentent un faible poids de naissance. Ils sont adoptés dès le premier jour de lactation soit par des rates contrôle (C), formant le groupe RC, soit par des rates R, donnant le groupe RR. Les ratons nés de rates nourries par un régime contrôle (C) sont adoptés aléatoirement par des mères contrôles, formant le groupe CC, ou par des rates restreintes en protéines, formant le groupe CR. Après 3 semaines de lactation, les ratons mâles sont sevrés et nourris avec un régime de croissance contenant 20% de protéines jusqu'au 40^{ème} jour de vie postnatale, puis reçoivent une alimentation contenant 16% de protéines.

Ces observations épidémiologiques rétrospectives ne permettent pas d'étudier précisément les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette programmation bien qu'ils soient supposés emprunter des voies métaboliques similaires. Pour autant, il est important de souligner qu'il existe un dimorphisme sexuel, les individus de sexe masculin étant davantage exposés aux maladies cardiovasculaires du fait qu'ils soient plus susceptibles de développer des altérations métaboliques. Ainsi, l'utilisation de modèles expérimentaux est essentielle afin d'étudier et de comprendre les mécanismes impliqués dans la programmation périnatale sur les systèmes métaboliques, physiologiques et neuroendocriniens qui régulent l'homéostasie énergétique et leur implication dans le développement du syndrome métabolique selon des fenêtres de développement spécifiques, c'est-à-dire intra-utérine ou postnatale. Différents modèles expérimentaux ont permis d'avancer dans la compréhension de ces altérations engendrées par un environnement périnatal délétère et de proposer quelques mécanismes associés.

Les modèles expérimentaux de programmation périnatale :

À ce jour, différents modèles expérimentaux sont utilisés pour explorer l'empreinte métabolique précoce et durable afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement des maladies cardio-métaboliques, ce qui permettrait de mieux comprendre pourquoi certains individus sont prédisposés à développer ces maladies sur le long terme alors que d'autres ne le sont pas ? Différentes espèces telles que les ovins, les porcs, les primates non humains ou encore les rongeurs sont utilisées. Dans ces modèles, la modification de la trajectoire de croissance ante- et/ou postnatale peut être induite par différentes manipulations du régime maternel au cours des phases de gestation et/ou de lactation (restriction calorique/protéique/de fer, régime hyperlipidique), par intervention chirurgicale en période gestationnelle (ligature des artères utérines), ou par l'administration de substances pharmacologiques à la mère gestante (glucocorticoïdes, streptozotocine). Une revue complète de ces différents modèles utilisés chez le rongeur dans la programmation métabolique a été réalisée par Warner et Ozanne en 2010.

Dans notre étude, nous avons utilisé un modèle de programmation métabolique chez le rat, induite par l'exposition à un régime hypoprotéique des mères gestantes puis allaitantes (Figure 4). Ce modèle présente bon nombre d'avantages et est utilisé par plusieurs équipes de recherche (Snøeck et al, 1990; Bieswal et al, 2004; Zambrano et al, 2005). En effet, la manipulation protéique maternelle en période périnatale reflète relativement bien les apports protéiques observés dans les pays en développement où le statut économique-social limite la

consommation quantitative en protéines (Symonds et al, 2009). De plus, ce modèle engendre une réduction des poids placentaires d'une part (Koshi et al, 1975), et des altérations endocrines et métaboliques d'autre part (Fernandez-Twinn et al, 2003), ce qui lui confère une pertinence physiologique solide par rapport à l'étude de la programmation métabolique.

Les mécanismes de programmation :

Les différents modèles expérimentaux qui ont été succinctement présentés ci-dessus, permettent d'étudier précisément les niveaux d'altérations physiologiques et les mécanismes impliqués dans la programmation métabolique qui se déroule en période périnatale. Il a ainsi été montré que des variations hormonales et/ou nutritionnelles pendant les périodes critiques de développement pourraient être à l'origine de phénomènes endocriniens et épigénétiques qui modifieraient durablement le métabolisme d'un individu.

La fenêtre de programmation du métabolisme par l'environnement périnatal correspond à la période de formation des organes clefs du métabolisme (pancréas, foie, tissu adipeux, muscle...). Les nombreuses altérations structurelles et/ou fonctionnelles, rapportées par plusieurs équipes sur ces différents organes, pourraient conduire à terme à l'apparition de pathologies (Figure 3) (Warner & Ozanne, 2010).

En effet, au cours du développement, la morphologie des organes serait profondément affectée par un environnement nutritionnel et hormonal inadéquat qui pourrait provoquer des perturbations telles que : une baisse de la vascularisation et de l'innervation des organes ou une altération de la juxtaposition des différents types cellulaires le formant. Dans le foie, par exemple, une moindre disponibilité nutritionnelle au cours de la juxtaposition spécifique des cellules endothéliales et des cellules de Kupffer, pourrait avoir des répercussions pérennes et délétères du fait que cette juxtaposition ait lieu pendant l'organogenèse et qu'elle influence le métabolisme hépatique (Si-Tayeb et al, 2010). De plus, le nombre de cellules et leur taille augmentent considérablement pendant le développement. Pour assurer cette importante croissance, les besoins nutritionnels doivent donc être adaptés et toute diminution des apports pourrait endommager le cycle cellulaire et diminuer la prolifération des cellules (Waterland & Garza, 1999). L'activité métabolique d'un organe étant dépendante de son nombre de cellules, une diminution pourrait affecter durablement son métabolisme.

Différentes hormones sont également impliquées dans la croissance fœtale dont celles à activité insulino-mimétiques comme les insulin-like growth factors (IGF) I et II et l'insuline. Elles sont réduites dans le cas d'un RCIU (Leger et al, 1996). Leurs concentrations dépendent

du statut nutritionnel, ainsi, une dénutrition maternelle peut induire une diminution de la glycémie fœtale et donc de son insulïnémie. Or l'insuline stimule la production hépatique d'IGF. Une dénutrition maternelle peut par conséquent, induire une baisse des concentrations sanguines en IGF-I chez le fœtus (Straus et al, 1991). Or des études *in vitro* ont pu montrer que les IGF peuvent bloquer l'apoptose, ce qui leur conférerait alors une activité protectrice au moment de la prolifération cellulaire rapide qui a lieu pendant le développement des organes. Il existe également des évidences quant à la programmation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien pendant la période fœtale suite à des apports caloriques maternels insuffisants (Lesage et al, 2001; Buhl et al, 2007).

Enfin, la structure des organes et l'expression des gènes sont aussi intimement liées. Des mécanismes épigénétiques ont été proposés afin d'expliquer les modifications structurelles et fonctionnelles observées chez la descendance exposée à un environnement périnatal délétère. Ces mécanismes impliquent que l'environnement (nutritionnel, chimique etc.) peut moduler l'expression des gènes par variations de la méthylation de l'ADN et/ou modifications post-traductionnelles des histones (ajout de groupement acétyl, phosphate), sans pour autant altérer les séquences nucléotidiques de l'ADN (Waterland & Michels, 2007; Attig et al, 2010). Ces processus favorisent alors la fixation de facteurs de transcription sur les promoteurs qui régulent positivement ou négativement l'expression des gènes cibles.

Une certaine flexibilité est accordée aux modifications épigénétiques, nutritionnelles et hormonales dans la programmation périnatale. Il est donc envisageable d'appliquer des traitements précoces qui permettraient de contrer les effets néfastes connus jusqu'alors.

La programmation périnatale pourrait ainsi, via différents mécanismes moléculaires, avoir de nombreuses répercussions sur le métabolisme général qui seraient à l'origine d'une dérégulation de l'homéostasie énergétique et mener sur le long terme au développement de pathologies cardio-métaboliques.

Dans les deux parties suivantes, nous aborderons plus précisément les définitions du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique, leur régulation, et les connaissances actuelles relatives à leur dérégulation dans le cadre de la programmation périnatale.

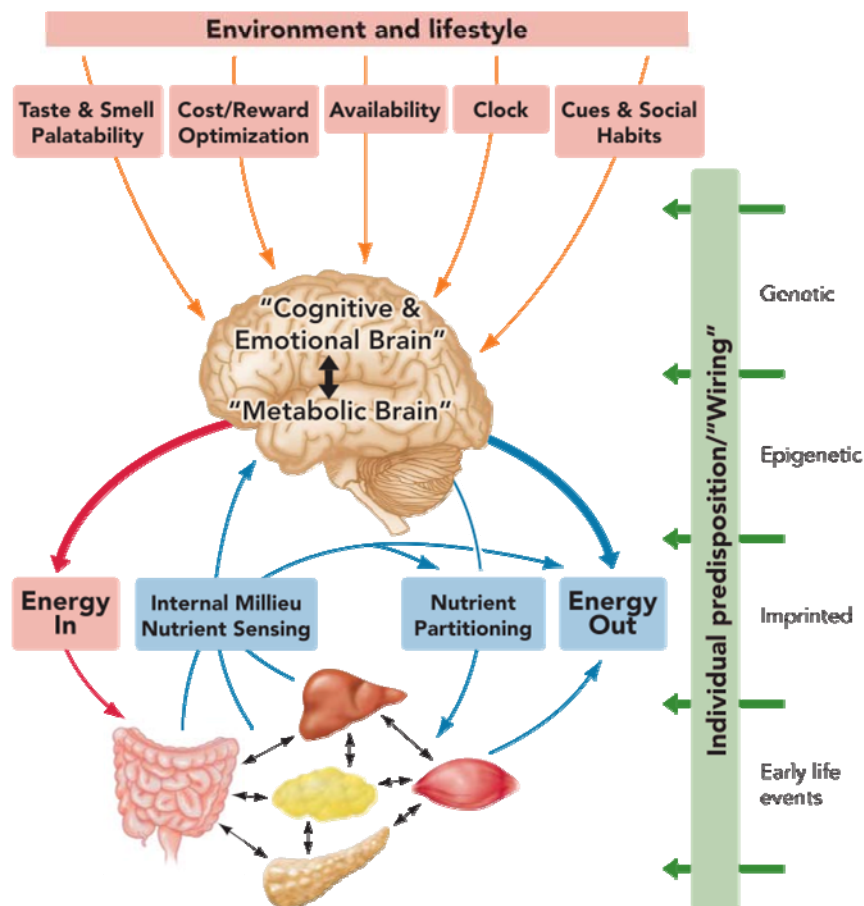


Figure 5. Facteurs endogènes et exogènes influençant le contrôle de la prise alimentaire et de l'équilibre énergétique (Zheng & Berthoud, 2008).

L'homéostasie énergétique dépend d'un équilibre dynamique entre les apports alimentaires et les dépenses, qui résultent principalement de l'activité physique et du métabolisme basal. Cet équilibre se traduit par la stabilité du niveau des réserves énergétiques, et plus largement par celle du poids corporel et de la masse grasse d'un individu. Sa régulation est orchestrée par le SNC qui, par un dialogue permanent avec les organes périphériques, maintient cet équilibre. Les signaux périphériques d'origine nutritionnelle, hormonale ou neuronale convergent vers les centres intégrateurs du cerveau pour générer une réponse adaptative comportementale (prise alimentaire) et une réponse des systèmes nerveux autonomes et endocriniens qui déterminent la répartition des nutriments, les dépenses énergétiques et de façon plus générale le bilan énergétique. Les mécanismes de réponse sont sous l'influence constante du mode de vie et de l'environnement via les régions cérébrales cognitives, sensibles et émotionnelles. L'ensemble des signaux périphériques et centraux ainsi que leurs voies de signalisation est sujet à une prédisposition individuelle déterminée par le patrimoine génétique ou par des mécanismes épigénétiques qui peuvent dépendre du milieu environnemental précoce.

2. Le comportement alimentaire et sa programmation par la nutrition périnatale

Le comportement alimentaire est l'une des composantes principales de l'homéostasie énergétique. Il correspond à l'ensemble des conduites d'un individu vis-à-vis de la consommation alimentaire (Berthoud & Morrison, 2008). D'un point de vue biologique, il s'agit d'un comportement finement régulé par des signaux centraux et périphériques qui renseignent sur le statut nutritionnel de l'organisme. Suite à l'émission de ces signaux de type hormonal, métabolique et nerveux, intégrés au niveau central, s'ensuit une réponse adaptée pour maintenir l'homéostasie énergétique, notamment via la prise alimentaire ou au contraire l'interruption du repas (Grayson et al, 2010). Ainsi la régulation de la prise alimentaire fait intervenir un jeu complexe de signaux de faim et de satiété qui constituent la boucle de contrôle de la balance énergétique (Figure 5).

2.1 La prise alimentaire, une régulation centrale

L'implication du cerveau, notamment de l'hypothalamus, dans la régulation de l'homéostasie énergétique, et plus spécifiquement du comportement alimentaire, apparaît dans les années 40 où la présence de lésions ou de stimulations électriques dans des régions distinctes de l'hypothalamus paraissent associées à une modification de la prise alimentaire ainsi que du poids corporel (Hetherington & Ranson, 1940; Anand & Brobeck, 1951). L'hypothalamus comprend plusieurs noyaux impliqués dans l'homéostasie énergétique tels que : le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau ventromédian (VMH), l'aire latérale hypothalamique (LHA) et le noyau dorsomédian (DMN). Ces noyaux expriment et sécrètent des neuropeptides aux fonctions physiologiques diverses, dont notamment des fonctions orexigènes et anorexigènes qui sont au centre de notre problématique, mais également de nombreuses autres fonctions touchant la reproduction, la température, ou encore le sommeil que nous ne détaillerons pas ici. L'activité des populations neuronales varie selon les signaux intra/extra-hypothalamiques et périphériques auxquels elles sont sensibles. Les neurones orexigènes sont activés en conditions de déficit énergétique et stimulent la prise alimentaire tout en diminuant les dépenses énergétiques (Kalra et al, 1991 ; Bertile et al, 2003). Au contraire, les neurones anorexigènes sont activés lorsqu'il y a pléthore d'énergie et vont inhiber la prise alimentaire et activer les dépenses énergétiques.

Ces populations neuronales agissent via des neurotransmetteurs de nature peptidique (NPY, AgRP, MCH, orexines, galanine, α -MSH, CART, TRH, CRH et ocytocine) ou non

peptidique (glutamate, γ -aminobutyric acid, dopamine, sérotonine). Les neuropeptides NPY, AgRP, POMC et CART sont sécrétés majoritairement par les populations neuronales de premier ordre tandis que MCH, les orexines, la galanine, la TRH, la CRH et l'ocytocine sont sécrétés par les populations neuronales de deuxième ordre (Figure 6).

Le noyau arqué :

Les neurones du noyau arqué (ARC) reçoivent l'information sur le statut énergétique à travers différents signaux périphériques (leptine, insuline, ghréline, glucose, acides gras; Figure 6). L'information est ensuite intégrée et relayée auprès d'autres noyaux hypothalamiques tels que le noyau paraventriculaire, l'aire latérale de l'hypothalamus, le noyau dorsomédian ou encore le noyau ventromédian. L'ARC est situé au niveau médio-basal de l'hypothalamus, dans une zone où la barrière hémato-encéphalique (BHE) est incomplète ainsi les signaux en provenance de la circulation sanguine atteignent les neurones de l'ARC par diffusion facilitée (Peruzzo et al, 2000) mais aussi par voie active via des transporteurs situés sur la BHE (Schwartz et al, 1991; Banks et al, 1996). Différentes populations neuronales sécrétant divers neuropeptides constituent l'ARC et sont détaillées ci-dessous.

Le neuropeptide Y (NPY) est l'un des peptides les plus abondants dans le cerveau (Allen et al, 1983). NPY exerce ses effets via 6 récepteurs transmembranaires nommés de Y1R à Y6R et distribués dans différentes aires du cerveau y compris la plupart des noyaux hypothalamiques (Parker et al, 1999; Festissov et al, 2004). Dans l'hypothalamus, NPY stimule la prise alimentaire et le gain de poids corporel (Stanley et al, 1986), augmente le stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc et réduit la thermogénèse du tissu adipeux brun (Egawa et al, 1991). Les concentrations hypothalamique de NPY augmentent en situation de jeûne et diminuent au cours de la prise alimentaire (Wynne et al, 2005).

L'Agouti-related protein (AgRP) est régulé de façon semblable à NPY. 90% des neurones exprimant NPY co-expriment AgRP (Stütz et al, 2005). Son expression, ses concentrations peptidiques et son activité augmentent en période de jeûne et diminuent pendant la réalimentation (Mizuno & Mobbs, 1999). Une seule injection intracérébroventriculaire d'AgRP peut induire une augmentation de la prise alimentaire jusqu'à une semaine (Stütz et al, 2005). AgRP exerce un effet antagoniste direct de l' α -Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH), sur les récepteurs aux mélanocortines (MC) de type MC3 et MC4. Pour autant, les mécanismes d'action impliqués dans l'effet orexigène de l'AgRP ne sont aujourd'hui que partiellement élucidés.

L' α -MSH provient du clivage du polypeptide pro-opiomélanocortine (POMC) qui produit d'une part les mélanocortines (α -MSH, γ -MSH, β -MSH, ACTH) et d'autre part les β -endorphines (Mains & Eipper, 1979). L'expression de POMC est réduite en période de jeûne et une administration centrale d' α -MSH ou de son agoniste le melanotan II diminue la prise alimentaire, le gain de poids, l'adiposité et augmente les dépenses énergétiques, l'activité du tissu adipeux brun ainsi que la température corporelle (Murphy et al, 2000; Hwa et al, 2001).

Dans l'ARC, CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) est exprimé dans la majorité des neurones à POMC mais dans le DMN et la LHA, CART co-localise avec la MCH (Elias et al, 2001; Hunter et al, 2004). Selon la zone d'injection, CART diminue la prise alimentaire (ARC) ou l'augmente (PVN, VMN, NTS : noyau du tractus solitaire) (Wang et al, 2000; Stanley et al, 2001; Kong et al, 2003). En plus de la prise alimentaire, CART a été impliqué dans les fonctions cardiovasculaires, de stress, de récompense et de remodelage osseux (Vicentic & Jones, 2007).

Le noyau paraventriculaire :

Les neuropeptides TRH (thyrotropin-releasing hormone) et CRH (corticotropin-releasing hormone) sont exprimés dans le PVN par deux populations neuronales distinctes (Lechan & Jackson, 1982; Swanson et al, 1983).

TRH stimule les dépenses énergétiques via son action sur l'hormone thyroïdienne (Lechan and Fekete, 2006). L'expression et la sécrétion de TRH sont réduites par le jeûne. De plus, une injection de thyrotropine diminue la prise alimentaire et augmente la température corporelle (Choi et al, 2002).

CRH joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique et est le neuropeptide majeur de l'axe du stress (axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien) (Richard et al, 2000). Ses concentrations décroissent en période de jeûne et augmentent après injection de CART ou d' α -MSH (Fekete et al, 2000; Smith et al, 2004).

L'aire latérale hypothalamique et autres noyaux hypothalamiques :

Les neuropeptides tels que la Melanin-Concentrating Hormone (MCH) et les orexines (orexine A et B) sont exprimés par des populations neuronales distinctes.

MCH est synthétisée dans la LHA et la *zona incerta* (région du sub-thalamus). Le jeûne augmente l'expression de MCH (Qu et al, 1996) mais NPY inhibe les neurones à MCH (van den Pol, 2004).

Les orexines sont présentes dans les neurones du LHA, du DMN et de l'aire périfornicale (Girault et al, 2012). Les études montrent qu'en réponse au jeûne l'expression des orexines par les neurones du LHA est augmentée ou inchangée (Tsujino and Sakurai, 2009). Les neurones à orexines sont également stimulés en condition d'hypoglycémie induite par injection d'insuline (Griffond et al, 1999). Pour autant, la fonction première des orexines dans la balance énergétique pourrait être la synchronisation du comportement alimentaire avec d'autres comportements comme les cycles veille/sommeil (Tsujino & Sakurai, 2009).

Des régions extra-hypothalamiques sont également impliquées dans la régulation centrale de la prise alimentaire et donc de l'homéostasie énergétique. L'hypothalamus est en étroite relation avec des régions faisant intervenir la perception hédonique (thalamus) – basée sur la palatabilité des aliments – les processus d'apprentissage et de conditionnement (système mésolimbique) – dont les circuits de la récompense impliquent des neuromédiateurs tels que le glutamate, les opioïdes, les endocannabinoïdes et la dopamine dont les sécrétions répondent à des signaux métaboliques dont la leptine et la ghréline sont les principaux (Erlanson-Albertsson, 2005) – ou encore le tronc cérébral où convergent les informations vagales (Noyau du Tractus Solitaire) (Figure 6) mais aussi les facteurs exogènes qui régulent les rythmes circadiens (noyau suprachiasmatique).

2.2 La prise alimentaire, une régulation périphérique

Un grand nombre d'hormones et de métabolites nutritionnels participent activement dans la régulation à court et à long terme de la prise alimentaire par la transmission du statut énergétique de l'organisme au cerveau par voie sanguine ou nerveuse (Figure 7).

Les hormones :

Un grand nombre d'hormones et de peptides comme la leptine, l'insuline, la cholécystokinine, l'entérostatine, le glucagon-like peptide-1, la ghréline etc. exercent un rôle dans l'homéostasie énergétique et envoient des signaux de satiété ou de faim au niveau central et/ou périphérique. La leptine et l'insuline sont considérées comme des signaux d'adiposité, leurs concentrations étant proportionnelles à la masse adipeuse de l'organisme, et agissent sur la régulation à long terme de la prise alimentaire.

La fonction première de l'insuline, sécrétée par les cellules beta du pancréas, est le contrôle de la glycémie (cf. section 3.2). À première vue, l'insuline présente des fonctions

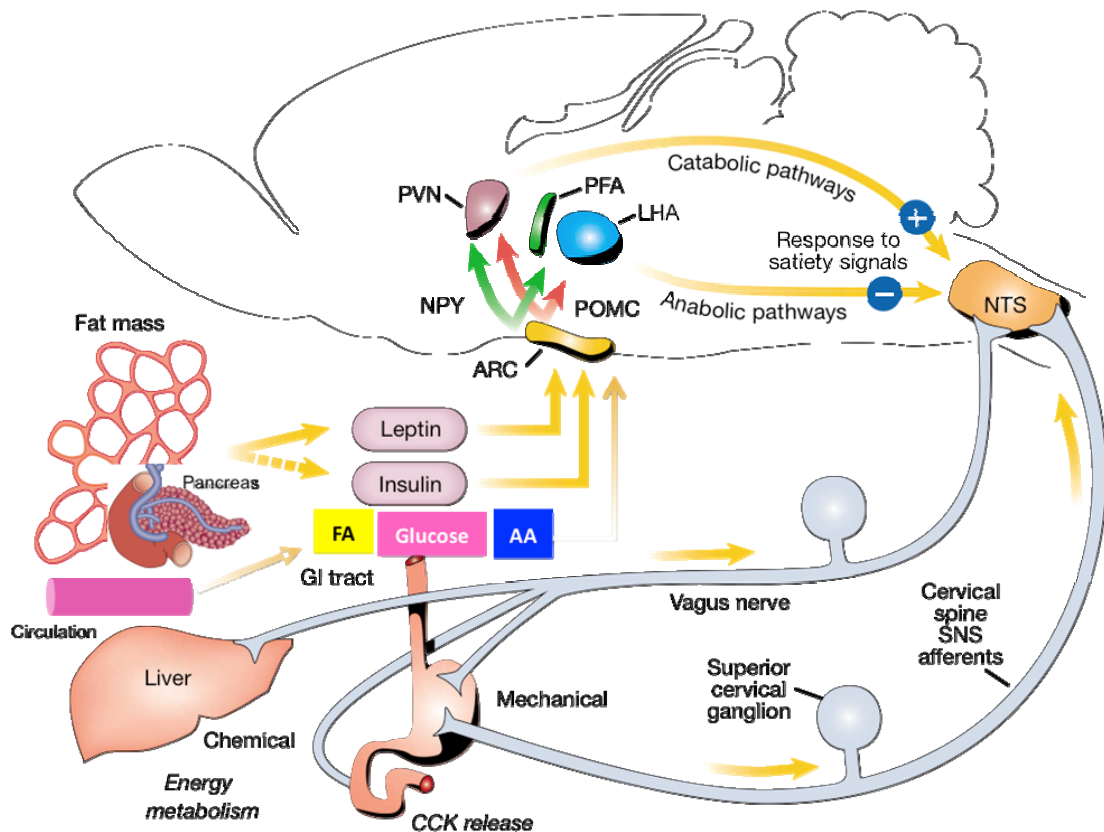


Figure 7. Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones du noyau arqué en réponse à l'intégration des signaux nerveux, hormonaux et nutritionnels délivrés par les tissus périphériques (modifié à partir de Schwartz et al, 2000).

L'insuline et la leptine, sécrétées respectivement par le pancréas endocrine et le tissu adipeux stimulent les voies cataboliques et inhibent les voies anaboliques au niveau central par la transduction de leur signal au sein des populations neuronales de l'ARC. Les signaux nutritionnels stimulent également les neurones de l'ARC, l'activation ou l'inhibition des voies métaboliques dépendant de la nature de la molécule. S'ensuit une réponse nerveuse via les projections de fibres nerveuses depuis l'ARC vers le PVN et la LHA où des connections sont établies avec le noyau du tractus solitaire, centre régulateur du système nerveux autonome (SNA) présents dans la partie postérieure du cerveau. Associé à ces signaux descendants relatifs aux nutriments et aux hormones, vont également s'ajouter des signaux nerveux afférents satiétogènes (dont mécaniques via la distension de l'estomac) qui sont véhiculés par le nerf vague et les fibres sympathiques en provenance du foie et du tractus gastro-intestinal qui interagiront avec le noyau du tractus solitaire (NTS). L'intégration centrale de l'ensemble de ces signaux nutritionnels, hormonaux et nerveux génèreront une réponse neuroendocrine et comportementale adaptative comme la fin d'un repas par exemple.

Les projections ascendantes de la zone postérieure vers la zone antérieure du cerveau qui pourraient contribuer à la réponse adaptative du comportement alimentaire ne sont pas montrées dans ce schéma.

AA, amino acid; FA, fatty acid; NTS, nucleus of the solitary tract; CCK, cholecystokinin.

paradoxales entre la périphérie et le SNC. En périphérie, elle exerce en effet une activité anabolique par sa capacité à promouvoir le stockage d'énergie dans le foie, le muscle et le tissu adipeux (Woods et al, 2000). Au contraire, elle augmente les dépenses énergétiques et exerce un rôle satiétogène au niveau central. L'insuline peut ainsi intervenir directement au niveau central sur l'homéostasie énergétique et spécifiquement sur la prise alimentaire.

L'insuline passe la BHE sous le contrôle de son récepteur IR (Woods et al, 2003). Son récepteur est exprimé dans plusieurs régions du SNC dont l'hypothalamus, avec de fortes densités dans l'ARC et de moindres concentrations dans les VMN, DMN et la LHA (Schwartz et al, 1992). La synthèse de NPY dans le PVN est diminuée après injection d'insuline (Williams et al, 2004) alors que l'expression des ARNm de POMC est augmentée dans l'ARC lorsque l'insuline est injectée par voie intrapéritonéale (Pritchard et al, 2002).

La leptine est la première des hormones et cytokines sécrétées par le tissu adipeux à avoir été découverte (1994). Le tissu adipeux constitue la source principale des réserves énergétiques mais également le lieu privilégié de sécrétion de la leptine. En moindre proportion, la leptine est également sécrétée par l'estomac, l'épithélium gastrique, le muscle squelettique ou encore le placenta (Ahima & Osei, 2004). La leptine est également présente dans le lait maternel et peut être assimilée par l'estomac immature des rats allaités (Casabiell et al, 1997). La leptine, qui vient du mot grec « *leptos* » qui signifie « mince », est impliquée dans la réponse au stress, dans la régulation de la reproduction et joue un rôle central dans le contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques (Harris, 2000). La leptine agit au niveau périphérique ainsi qu'au niveau du SNC où elle inhibe la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques. La leptine passe la BHE via l'isoforme ObRa dont la fonction serait d'assurer le transport de la leptine dans le cerveau. La transduction du signal de la leptine fait intervenir le récepteur ObRb (d'autres isoformes existent mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit). Ce dernier est fortement exprimé dans l'ARC mais est également trouvé dans d'autres noyaux de l'hypothalamus (Elmquist et al, 1998) et notamment sur les neurones à NPY/AgRP et POMC. D'une part, la leptine diminue l'expression de NPY et AgRP et d'autre part, elle augmente l'expression des ARNm de POMC.

Les nutriments :

Les métabolites issus des apports alimentaires sont indispensables à l'intégrité cellulaire (source d'énergie) mais pourraient également être impliqués dans des mécanismes de

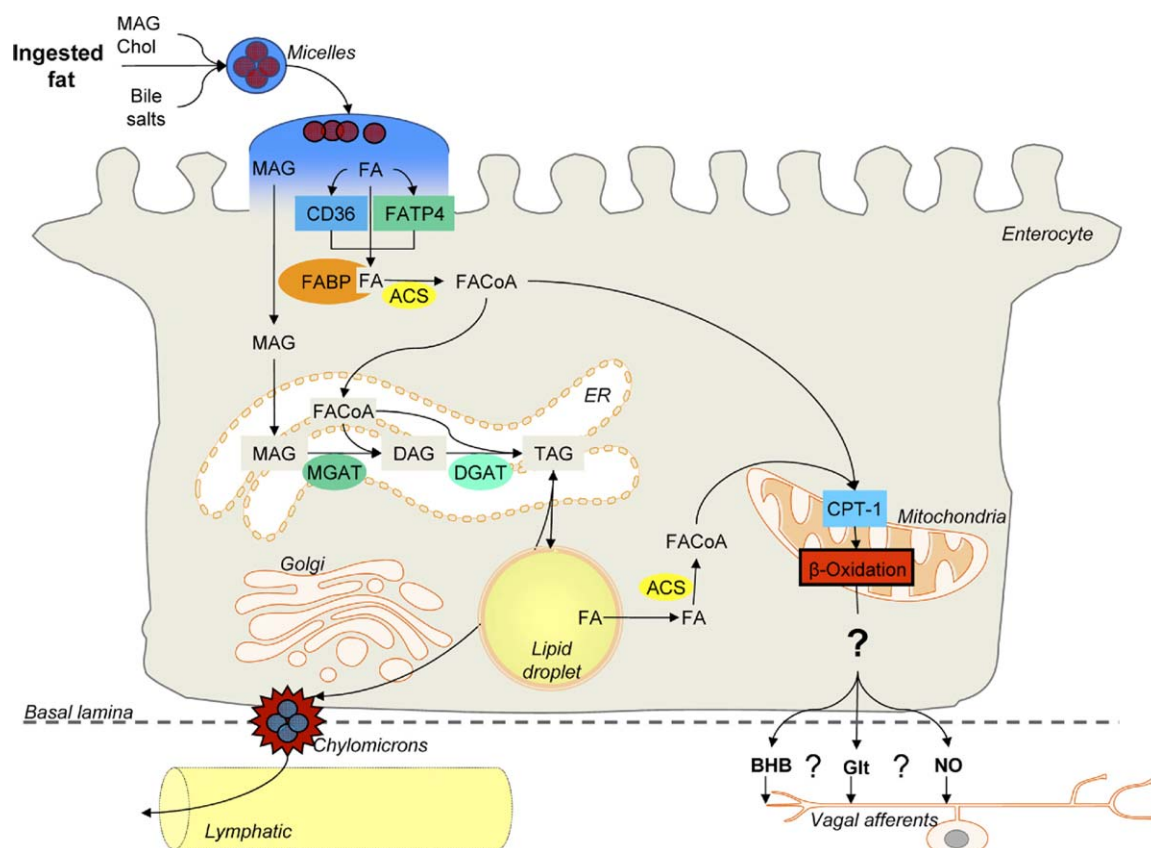


Figure 8. Représentation schématique potentielle expliquant le mécanisme selon lequel l'oxydation des acides gras dans les entérocytes pourrait influencer la prise alimentaire (Langhans et al 2011).

Seules les voies métaboliques principales sont représentées par souci de simplicité. Différents mécanismes détectent la présence de triglycérides dans le tractus digestif et relient leur ingestion à la régulation de l'homéostasie. De façon générale, les lipides sont digérés puis absorbés dans l'intestin grêle. Tandis que les acides gras à chaîne courte et le glycérol passent de la lumière intestinale à la circulation sanguine, les acides gras (AG) à longue chaîne, les triglycérides, le cholestérol, les phospholipides etc. passent dans les vaisseaux lymphatiques sous forme de chylomicrons avant de rejoindre la circulation sanguine via le canal thoracique. Ici les auteurs proposent par ce schéma que l'énergie dérivée de l'oxydation des triglycérides dans les entérocytes serait transmise aux afférences vagales de l'intestin, ce qui conduirait à la diminution de la prise alimentaire. L'intestin aurait alors un rôle de senseur de l'oxydation des acides gras.

ACS, acyl-CoA synthase; BHB, β -hydroxybutyrate; Chol, cholestérol; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase-1; DAG, diacylglycerol; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; FA, fatty acid; FABP, fatty acid binding protein; FFA, fatty acyl-coenzyme-A; FATP, fatty acid transport protein; Glt, glutamate; NO, nitric oxide; MAG, monoacylglycerol; MGAT, monoacylglycerol transferase; TAG, triglycerides; ER, endoplasmic reticulum.

signalisation auprès des circuits neuronaux hypothalamiques pour renseigner sur le statut énergétique de l'organisme. Ainsi les métabolites nutritionnels tels que le glucose, les acides gras, les acides aminés et leurs dérivés agissent auprès de l'ARC et d'autres neurones de l'hypothalamus par voie directe ou via d'autres intermédiaires suite à leur catabolisme en périphérie. En effet, de nombreux travaux conduits durant les 50 dernières années montrent que l'oxydation des substrats énergétiques au niveau central est à l'origine de ces signaux qui permettent au cerveau de contrôler la prise alimentaire (Levin et al, 2004) par voie AMP-kinase dépendante ou mTOR (mammalian target of rapamycin) dépendante. Ces observations ont été confirmées par de récents travaux dont certains montrent qu'une délétion hypothalamique du transporteur de glucose 2 (Marty et al, 2006) ou de la glucokinase (Yang et al, 2007) induit une augmentation significative de la prise alimentaire, démontrant que certains neurones sont sensibles aux variations de glucose. D'autres neurones répondent également aux acides gras et acides aminés qui, lorsqu'ils sont administrés par voie cérébrale, suppriment la prise alimentaire et altèrent le métabolisme périphérique du glucose (Kahn et al, 2005; Cota et al, 2006). Par leur catabolisme en périphérie, les nutriments peuvent également exercer des signaux qui pourraient moduler la prise alimentaire. Bien qu'il ait été montré que l'oxydation des acides gras en périphérie soit impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire (Scherrer & Langhans, 1986), les mécanismes restent en grande partie non élucidés. Une équipe a récemment proposé que l'énergie dérivée de l'oxydation des triglycérides dans les entérocytes permettrait la transmission de signaux au système vagal afférent et entraînerait ainsi une diminution de la prise alimentaire (Figure 8) (Langhans et al 2011).

Le système nerveux autonome :

Le système nerveux autonome (SNA) est composé des systèmes nerveux para- et orthosympathique aux effets antagonistes et complémentaires pour un organe donné. Tandis que les fibres parasympathiques véhiculent l'information via le nerf vague utilisant l'acétylcholine comme neuromédiateur, les fibres orthosympathiques (appelées également sympathiques) transmettent l'information par le nerf splanchnique avec la noradrénaline comme neuromédiateur. Le système nerveux parasympathique exerce une activité anabolique, stimule la sécrétion d'insuline par les cellules beta du pancréas mais également la glycogénèse hépatique et la capture de glucose dans le tissu adipeux (Nonogaki, 2000). Au contraire, le système nerveux sympathique exerce une activité catabolique. Il stimule la

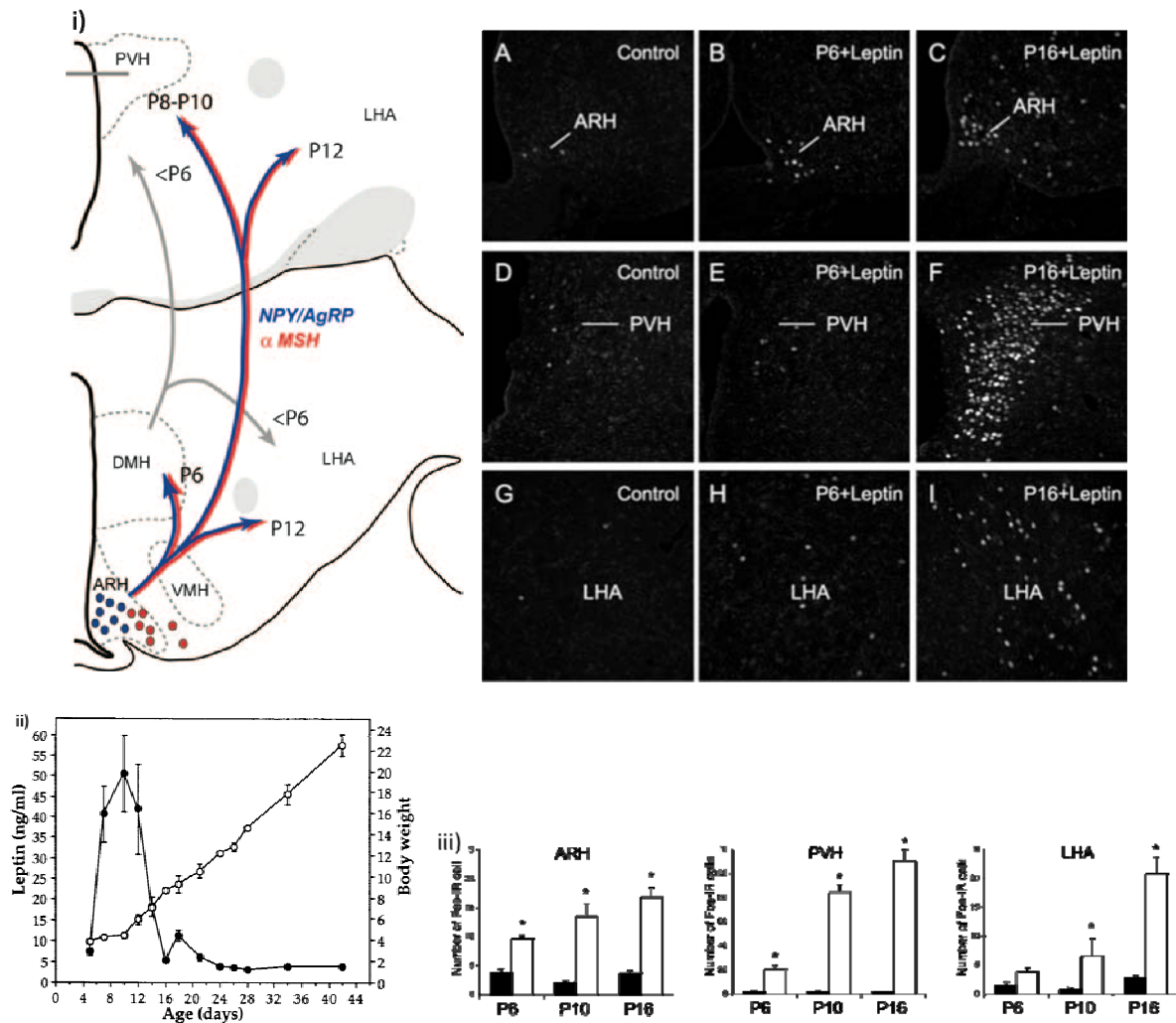


Figure 9. Évidences du rôle neurotrophique de la leptine au niveau hypothalamique en période périnatale. (i) Schéma simplifié du développement hypothalamique des fibres impliquées dans la régulation de la prise alimentaire chez la souris (Bouret & Simerly, 2006). (ii) Pic de leptine en fonction de la prise de poids pendant la période postnatale (Ahima et al, 1998). (iii) Images confocales illustrant l'immunoréactivité de cFos (Fos-IR) dans l'ARH (A-C), le PVH (D-F) et la LHA (G-I) 90 min ou 120 min après l'administration intra-péritonéale de leptine (10 mg/kg) à 6 (P6) ou 16 jours de vie (P16) chez la souris et nombre de Fos-IR dans ces noyaux hypothalamiques à P6, P10 et P16 (Bouret et al, 2004).

Les projections axonales de l'ARH se développent en période postnatale à 6 jours de vie vers le DMH, entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour vers le PVH. Les projections allant de l'ARH vers la LHA s'établissent vers le 12^{ème} jour alors que les projections depuis le DMH vers le PVH et la LHA apparaissent à partir de 6 jours de vie. Le nombre de projections axonales est augmenté avec l'injection de leptine. La présence d'un pic de leptine pendant la lactation est un processus normal et ses propriétés neurotrophiques sont indispensables au bon développement des circuits neuronaux qui sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et plus largement dans l'homéostasie énergétique.

sécrétion de glucagon par le pancréas, la glycogénolyse et la gluconéogenèse par le foie, la capture de glucose et la glycogénolyse au niveau musculaire et enfin, il stimule la lipolyse dans le tissu adipeux et par conséquent la libération d'acides gras non estérifiés (AGNE) dans la circulation sanguine.

Le rôle du SNA dans l'homéostasie énergétique va consister à maintenir l'équilibre entre les dépenses d'énergie et leur économie. C'est donc indirectement que le SNA va jouer sur le comportement alimentaire par la stimulation ou l'inhibition de la libération d'acides gras ou de glucose dans la circulation dont l'impact sur le SNC a été présenté dans le point précédent.

2.3 Les évidences de la programmation du comportement alimentaire, un lien vers le développement de l'obésité ?

Dans la section 1.3, nous avons pu voir que les variations nutritionnelles et hormonales au cours de la période fœtale et pendant les premiers jours de vie pourraient interférer irréversiblement sur le développement structurel ainsi que fonctionnel des organes impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. La leptine est un candidat important en ce qui concerne ces processus au niveau du système nerveux central. Dans cette section, nous présenterons la fonction neurotrophique de la leptine au cours du développement précoce et le lien potentiel entre une altération de ces concentrations à ce stade de la vie et le comportement alimentaire décrit à l'âge adulte chez des individus exposés à un environnement nutritionnel périnatal délétère.

Rôle de la leptine dans le développement cérébral :

Dans les sections précédentes nous avons vu que la leptine exerçait un rôle important sur l'homéostasie énergétique via ses nombreux effets sur le SNC et notamment sur les structures hypothalamiques. Cependant, de récentes études ont montré que la leptine exerçait également un rôle critique en période précoce, indépendant de ceux présentés ci-dessus, sur la neurogenèse et la mise en place des réseaux neuronaux hypothalamiques impliqués dans la régulation du comportement alimentaire, des dépenses énergétiques et du stockage d'énergie.

À la naissance, chez les rongeurs, le SNC est à un stade développemental immature puisque les neurones de l'ARC, qui sont au carrefour des signaux de satiété et de faim, se développent entre 11,5 et 12,5 jours de vie embryonnaire (Ifft, 1972) mais ne deviennent

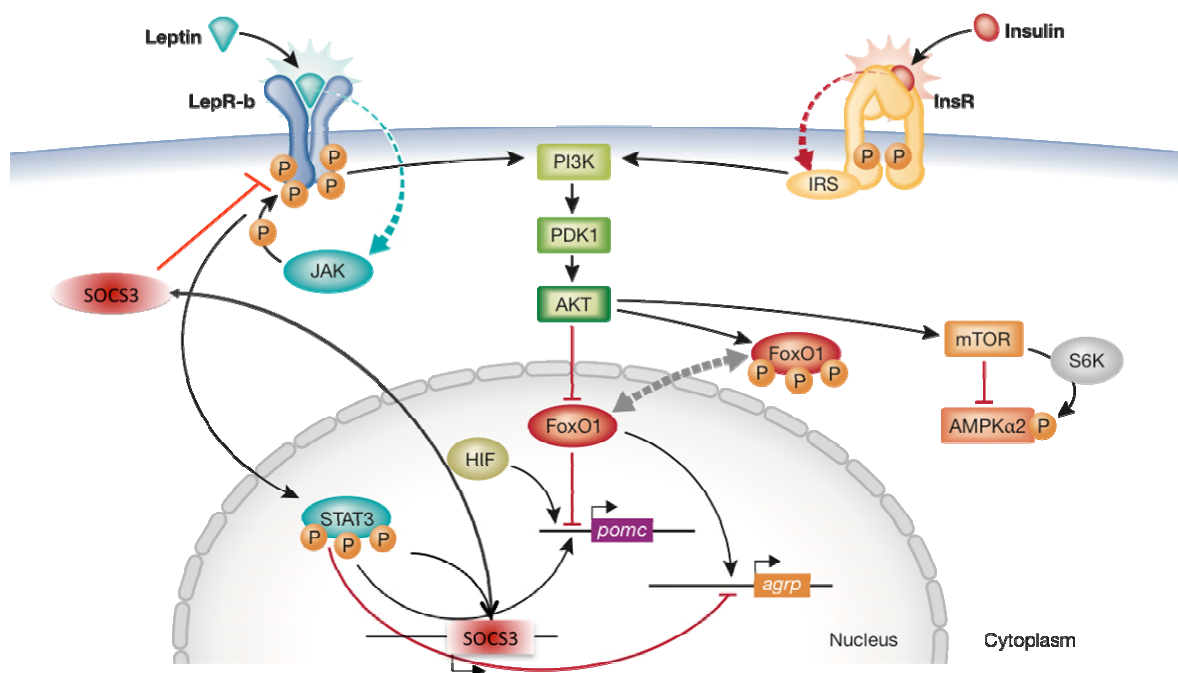


Figure 10. Voie de signalisation de la leptine et de l'insuline dans le noyau arqué (modifié à partir de Varela & Horvath, 2012).

La fixation de la leptine au domaine extracellulaire du récepteur LepRb, membre de la superfamille des récepteurs aux cytokines, induit la dimérisation du récepteur et l'activation des protéines Janus kinases (JAK), une famille de tyrosine kinase impliquée dans la signalisation intracellulaire. Ceci entraîne la phosphorylation de STAT3 (signal transduction and activators of transcription 3) sur la Tyrosine 1138 du domaine intracellulaire du récepteur. Ces protéines sont ensuite transloquées dans le noyau ce qui active la transcription du gène POMC et inhibe celle du gène codant AgRP. L'accumulation nucléaire de STAT3 augmente également la transcription de SOCS3 (suppressor of cytokine signalling-3), un inhibiteur de la voie de signalisation de la leptine (Bjorbaek et al, 1998). La fixation de la leptine au récepteur LepRb entraîne également l'activation des voies de signalisation IRS/PI3 kinase d'une part, et MAPK/ERK/cfos d'autre part, également impliquées dans la transduction du signal de l'insuline (voir figure 16).

Lors du développement d'une leptino-résistance, différents mécanismes peuvent être impliqués et être associés au développement d'une obésité (Howard et al, 2004). Parmi ces mécanismes, on compte : a) une diminution du transport de la leptine au travers de la BHE via son transporteur LepRa (Caro et al, 1996; Schwartz et al, 1996), b) une perturbation du signal de transduction due à une moindre expression du récepteur LepRb (Baskin et al, 1998) ou encore c) une sur-expression de SOCS3 et donc une diminution de l'activité de STAT3 (Bjorbaek et al, 1998).

fonctionnels qu'après le développement complet des projections depuis l'ARC vers les autres noyaux hypothalamiques à la fin de la deuxième semaine de lactation (Figure 9). L'établissement de ces circuits neuronaux a lieu sous le contrôle de facteurs neurotrophiques tels que la leptine, l'insuline, le BDNF ou l'IGF-1 (Bouret et al, 2004). La leptine apparaît être un facteur clef dans le développement de ces projections axonales et la présence d'un pic de leptine entre le 4^{ème} et le 16^{ème} jour de la vie postnatale serait nécessaire pour un développement correct du cerveau et des circuits neuronaux impliqués dans la prise alimentaire (Bouret et al, 2004).

Ainsi un excès ou l'absence de leptine pendant la période périnatale pourrait potentiellement être à l'origine de changements durables des circuits neuronaux de la prise alimentaire et donc du comportement alimentaire ce qui pourrait prédisposer au développement de maladies chroniques telle que l'obésité. Plusieurs études ont montré qu'une dénutrition maternelle périnatale conduit soit à une réduction de l'amplitude du pic de leptine (Delahaye et al, 2008) soit à un pic de leptine prématuré avec des conséquences durables sur le nombre de neurites et de projections depuis l'ARC (Yura et al, 2005; Coupé et al, 2009). Un pic de leptine prématuré serait également associé à une accélération du gain de poids et de l'adiposité de la descendance (Yura et al, 2005; Coupé et al, 2012) ainsi qu'à la présence d'une hyperphagie et d'une leptino-résistance chez des rats adultes ayant reçu des injections sous-cutanées de leptine au cours de la lactation (Toste et al, 2006) ou ayant fait l'expérience d'un rattrapage de croissance en période de lactation après induction d'un retard de croissance intra-utérin (Coupé et al, 2012). Des modifications quant à l'expression du récepteur ObRb à des temps précoces dans différents noyaux hypothalamiques ont également été reportées chez des rats nés avec un RCIU (Cripps et al, 2009; Cottrell et al, 2009) ce qui pourrait être associé à une augmentation du risque de développer une leptino-résistance et une obésité sur le long terme (Figure 10).

Leptino-résistance, comportement alimentaire et obésité :

L'une des plus grandes cause de l'obésité étant probablement la suralimentation, la programmation du développement d'une leptino-résistance pourrait ainsi en partie expliquer la prédisposition des individus nés avec un petit poids de naissance à devenir obèse. Cependant, on peut imaginer, du fait des évidences présentées ci-dessus concernant les variations des concentrations de certains facteurs neurotrophiques face à un environnement nutritionnel périnatal délétère, que l'altération du développement d'autres circuits neuronaux pourrait conduire à une surconsommation alimentaire. Ces altérations pourraient affecter les

réseaux neuronaux impliqués dans les circuits de la récompense (Whitaker et al, 2012), ou bien la signalisation des peptides impliqués dans la satiété spécifique à un macronutriment donné (Erlanson-Albertsson, 1997). À ce jour, il n'existe, à notre connaissance, aucune étude qui ce soit intéressée à cette deuxième composante dans le cadre de la programmation métabolique.

De nombreuses études, pour la plupart réalisées chez le rat, décrivent que le comportement alimentaire pourrait être modifié sur le long terme suite à des variations nutritionnelles au cours de la période périnatale. La réponse adaptative du comportement alimentaire, face à l'environnement nutritionnel présenté à l'âge adulte, serait dépendante de la fenêtre de temps précoce à laquelle aura été présentée l'alimentation délétère à la mère. Certaines études suggèrent que la descendance adulte de rates nourries avec un régime hypoprotidique de la mi-gestation à la naissance, présente une augmentation de la prise alimentaire (Bellinger et al, 2006). Au contraire, quand les mères sont exposées à un régime hypoprotidique pendant toute la période de la gestation, la descendance montre une consommation alimentaire réduite à l'âge adulte et en cas d'exposition à un régime de laboratoire (Bellinger et al, 2004). Lorsqu'il est offert à cette descendance le choix d'un régime riche en lipides, en carbohydrates ou en protéines, une préférence pour l'aliment gras est observée chez les femelles et chez les mâles à 12 semaines de vie (Bellinger et al, 2004). Cette préférence persiste à 30 semaines pour les femelles mais pas pour les mâles. Dans une étude conduite par une autre équipe sur des animaux également nés de mères restreintes en protéines pendant la gestation (Palou et al, 2010), les rats mâles âgés de 12 semaines, libres de choisir entre un aliment riche en carbohydrates ou riche lipides, choisiront préférentiellement l'aliment riche en carbohydrates alors qu'aucune différence n'apparaît pour les femelles du même âge. À 24 semaines, il ressort que les animaux, quelque soit le sexe, conservent le comportement alimentaire observé à 12 semaines. Cependant, à 24 semaines d'âge et après une exposition de 9 semaines à un régime hyperlipidique, les différences observées sur les choix alimentaires n'apparaissent plus, ni chez les mâles, ni chez les femelles. Au contraire, ces différences sur le choix alimentaire sont conservées chez les animaux contrôles mâles et une préférence pour l'aliment riche en lipides est observée chez les contrôles femelles. Ainsi, en terme de préférences ou de prise alimentaire, les résultats diffèrent selon l'âge, le sexe et la fenêtre de manipulation protéique précoce. De plus, des évidences moléculaires existent quant à l'altération de la réponse des facteurs de signalisation (glucose, insuline, leptine...) régulant l'homéostasie énergétique (Fernandez-Twinn & Ozanne, 2012) ou appartenant aux centres

intégrateurs des signaux de faim et de satiété au niveau hypothalamique (Langley-Evans et al, 2005). Bien qu'il reste encore beaucoup de parts d'ombre quant aux mécanismes impliqués dans cette programmation, les modifications moléculaires présentées pourraient contribuer aux changements observés sur le comportement alimentaire et établir un lien entre la nutrition périnatale et le risque de développer un syndrome métabolique sur le long terme.

Le comportement alimentaire pourrait ainsi être modifié suite à l'exposition périnatale à un environnement nutritionnel délétère. Les mécanismes associés demeurent mal connus mais ceux décrits pourraient en partie expliquer la prédisposition des individus nés avec un petit poids de naissance à développer sur le long terme un syndrome métabolique.

Des mécanismes impliquant le métabolisme énergétique pourraient également contribuer au développement du syndrome métabolique. Nous tenterons d'apporter quelques éléments de réponse quant à cette question dans le dernier volet de ce premier chapitre puis par la présentation de nos résultats.

3. Le métabolisme énergétique et sa programmation par la nutrition périnatale

Le métabolisme énergétique comprend l'ensemble des voies énergétiques anaboliques et cataboliques, des substrats nutritionnels (glucide-4 kcal/g, lipide-9 kcal/g, protéine-4 kcal/g) et des organes de l'organisme impliqués dans la production, l'utilisation ou le stockage d'énergie. Les substrats énergétique trouvent leur origine dans l'alimentation et permettent :

- 1) de satisfaire les besoins immédiats en ATP (Adenosine tri-phosphate) par leur oxydation et
- 2) de reconstituer les réserves de glycogènes et de protéines. Suite à un épisode alimentaire et après avoir répondu au renouvellement cellulaire et aux besoins tissulaires, l'organisme constitue des réserves. Au contraire, en période de jeûne, les métabolites et réserves énergétiques sont mobilisés puis oxydés pour produire de l'énergie (Figure 11). À ces réactions métaboliques d'anabolisme et de catabolisme, sont associées des transferts d'énergie positifs et/ou négatifs.

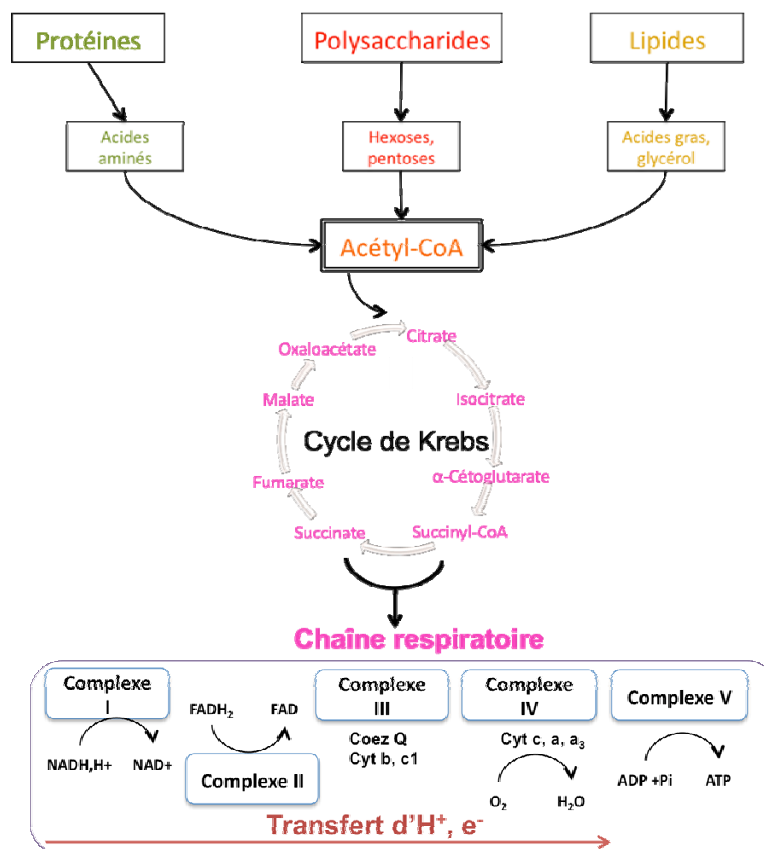


Figure 11. Schéma des grandes étapes du métabolisme catabolique

En période de restriction énergétique et lorsque la cellule est en condition aérobie, les substrats énergétiques (principalement les lipides et hydrates de carbone) sont oxydés et assurent la production d'une quantité réduite d'énergie sous forme d'ATP (Adenosine Tri-phosphate) et d'équivalents réduits (NADH, FADH₂). L'oxydation des glucides, lipides et protéines alimentaires conduit à la formation d'acétyl-CoA qui intégrera ensuite le cycle de Krebs encore appelé cycle tricarboxylique (TCA) où des équivalents réduits sont produits. L'entrée de l'acétyl-CoA dans le TCA permet de produire 1 molécule d'ATP, 3 de NADH, H⁺, 1 de FADH₂ et 2 de CO₂. Les équivalents réduits produits par l'oxydation des nutriments et au cours du cycle de Krebs peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons aux complexes de la chaîne respiratoire qui se déroule dans la membrane interne mitochondriale pour produire de l'ATP pendant l'oxydation phosphorylante. L'oxydation d'une molécule de glucose et de l'acide palmitique (acide gras à 16 carbones) conduit respectivement à la formation de 32 et 96 molécules d'ATP.

Dans des conditions de pléthore énergétique (non détaillé dans le schéma), les nutriments assurent d'autres fonctions. Les glucides ont un rôle structural et de synthèse des nucléotides au travers de la voie des pentoses. Les lipides ont une fonction structurale (éléments de la membrane cellulaire) et fonctionnelle (précurseurs des eicosanoïdes, du diacylglycérol, des hormones stéroïdes...). Enfin, les protéines ont un rôle structural, de transporteur (ex. l'albumine ou la FABP – fatty acid-binding protein, transportent les acides gras; les GLUT, transportent le glucose), dans les défenses immunitaires (anticorps), dans la régulation métabolique via les hormones, dans la catalyse des réactions biochimiques par leur fonction d'enzyme.

Coez coenzyme; Cyt, cytochrome; H, hydrogène; e⁻, électron; FAD

3.1 Les grandes étapes du métabolisme énergétique et ses facteurs de régulation

L'activation des voies métaboliques et l'utilisation des substrats énergétiques par l'organisme dépendent de son état métabolique et hormonal. Le glucose est la source principale d'énergie d'un organisme et circule librement dans le sang à des concentrations oscillant entre 4 et 7 mM. Cependant, suite à un stress nutritionnel comme celui imposé par le jeûne, ses concentrations baissent. L'homéostasie énergétique est alors assurée par un ensemble d'acteurs enzymatiques, hormonaux, transcriptionnels et métaboliques qui orientent la consommation de substrats d'origine glucidique vers celle de substrats de nature lipidique.

Le foie, véritable carrefour métabolique, joue un rôle fondamental dans cette adaptation métabolique. Suite à la baisse des concentrations en insuline qui se produit en période de jeûne, les réserves de glycogène hépatique sont mobilisées pour former du glucose via la glycogénolyse (Figure 12). Ces réserves étant peu importantes, s'ensuivent d'une part une augmentation de la β -oxydation des acides gras (devenant le substrat énergétique majoritaire), et d'autre part l'activation de la production de glucose à partir de substrats non glucidique (gluconéogenèse). Le foie est le seul organe capable de libérer du glucose dans le sang (production rénale mineure), son rôle est donc primordial dans le maintien des taux circulants de glucose. Les substrats glucogéniques comprennent : 18 acides aminés, via leur conversion en pyruvate ou l'un des 4 métabolites du TCA (Figure 13, Stipanuk, 2006); le glycérol, libéré lors de la lipolyse adipocytaire; et le lactate, formé pendant la glycolyse anaérobie (Figure 14). La gluconéogenèse est activée par un ratio insuline/glucagon faible. Ce dernier active également l'oxydation des acides gras. En effet, l'activité de l'HSL (Hormone-sensitive lipase) augmente dans les adipocytes suite à une phosphorylation plus importante de l'enzyme induite par le glucagon. La lipolyse est alors activée et les triglycérides stockés dans les adipocytes sont hydrolysés et libérés dans la circulation sanguine en tant que glycérol et acides gras non estérifiés (AGNE) où ils seront captés par la plupart des tissus pour être catabolisés par β -oxydation (Figure 14). Les AGNE à longue chaîne se lient à l'albumine dans la circulation puis à la FABP (Fatty acid-binding protein) ou au FAT/CD36 (Fatty acid transporter) dans la cellule. Lorsque la vitesse de β -oxydation des acides gras est importante, comme dans des conditions de jeûne, de régime hyperlipidique ou pendant une activité physique, l'acétyl-CoA formé par le catabolisme des acides gras et des acides aminés est utilisé par les mitochondries hépatiques pour la synthèse de corps cétoniques (Figure 14). Ces

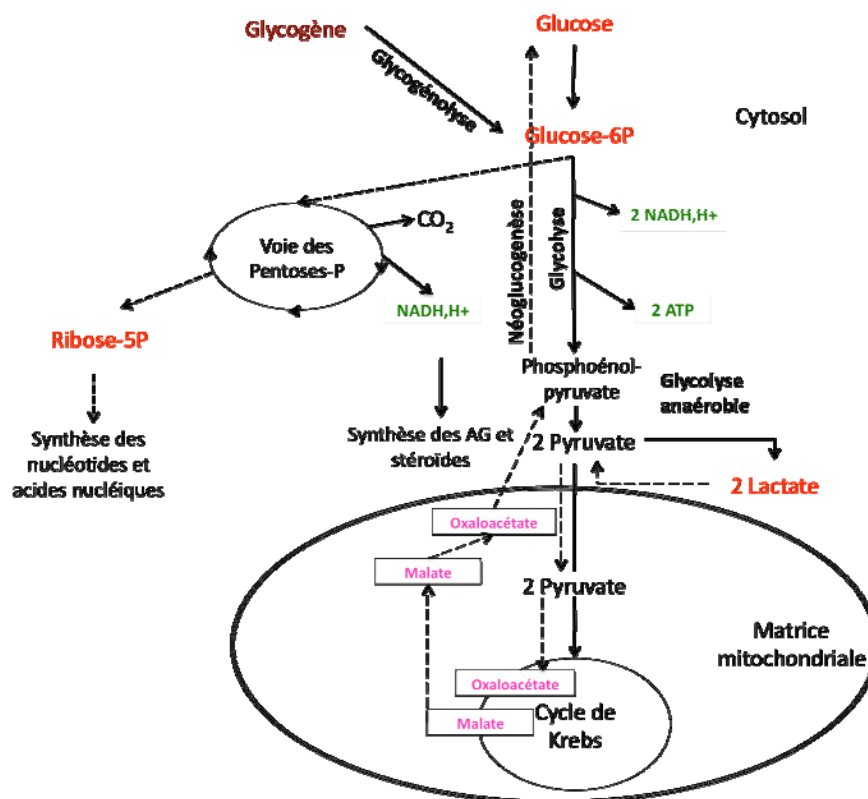


Figure 12. Schéma général du métabolisme du glucose

En période de restriction énergétique, le glucose peut être oxydé en pyruvate (glycolyse aérobie) ou fermenté en lactate (glycolyse anaérobie, et constitue ainsi le seul substrat énergétique à pouvoir produire de petites quantités d'ATP en anaérobiose. La glycolyse comporte 10 réactions successives qui permettent l'oxydation progressive d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate, d'eau, d'ATP et de NADH réduit. Trois réactions enzymatiques sont irréversibles : celles catalysées par la 6-hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase (Hue & Taegtmeyer, 2009). Lorsque les apports en oxygène sont suffisants, la glycolyse se poursuit par la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA et NADH,H+ dans la matrice mitochondriale sous l'action d'un complexe tri-enzymatique : la pyruvate déshydrogénase. L'énergie contenue dans une molécule d'acétyl-CoA et de NADH,H+ sera libérée via le TCA et la chaîne respiratoire. En revanche, le pyruvate est fermenté en lactate en conditions d'anaérobiose sous la catalyse de la lactate-déshydrogénase (LDH) en présence de NADH,H+. La glycolyse anaérobie se déroule dans le cytosol des cellules ne contenant pas de mitochondries (érythrocytes) ou faiblement vascularisées (cellules de la muqueuse intestinale, de la rétine, de la médullo-rénale) ou encore dans les cellules du muscle squelettique lors d'un effort intense quand l'approvisionnement en oxygène est insuffisant. Le lactate produit diffuse ensuite dans le sang avant d'être capté par les tissus où il sera soit transformé en acétyl-CoA pour entrer dans le TCA soit reconverti en glucose dans le foie au cours de la néoglucogénèse lactique (voie consommatrice d'ATP).

En période alimentaire, une fois les besoins énergétiques satisfaits, le glucose est stocké pour constituer des réserves énergétiques sous forme de glycogène, principalement dans le foie et les muscles, ou de glycérol, qui sera utilisé pour former des triglycérides.

composés représentent un relais énergétique pour le cerveau et les muscles en cas de jeûne prolongé et constituent la source principale d'énergie cérébrale en période périnatale¹. Les corps cétoniques (acétoacetate, β -hydroxybutyrate) sont ensuite exportés vers des tissus extra-hépatiques où ils seront oxydés (Zammit, 1994; McGarry & Brown, 1997). La cétogenèse ne consomme pas d'ATP mais utilise le NADH,H⁺ apporté par l'oxydation des acides gras. Ainsi, le potentiel redox des mitochondries hépatiques, caractérisé par le ratio NADH/NAD⁺, est primordial dans la régulation de la cétogenèse. Un ratio bas diminue les capacités cétogéniques des hépatocytes.

Derrière cette orchestration de l'utilisation des substrats énergétiques en condition de jeûne, se dessinent des mécanismes biochimiques précis, outre la régulation hormonale présentée succinctement ci-dessus, qui permettent d'expliquer la compétition existant entre l'utilisation du glucose et celle des acides gras. En 1963, Philip Randle et al (Randle et al, 1963) proposèrent un cycle entre le glucose et les acides gras (« glucose-fatty acid cycle) qui décrit chez les mammifères une interaction dynamique entre les substrats énergétiques et qui

¹ L'activité cérébrale est assurée par les neurones qui s'approvisionnent en glucose. Les astrocytes et autres cellules gliales forment l'environnement des neurones et parmi leurs différentes fonctions, elles assurent le maintien de l'homéostasie énergétique en apportant nutriments et oxygène aux neurones. Historiquement, il était reconnu que le cerveau utilisait essentiellement le glucose comme source d'énergie puis les corps cétoniques en cas de jeûne prolongé, transportés respectivement par les GLUT et MCT (transporteur de monocarboxylates) et ne pouvait métaboliser les acides gras circulants. Pourtant de récentes études ont clairement démontrées qu'au cours du jeûne il se produit également dans le cerveau un « switch » de l'utilisation du glucose vers celle des acides gras, et spécialement dans l'hypothalamus (Poplawski et al, 2010). Des études précédentes indiquent que chez le rat adulte plus de 50% de l'acide palmitique qui entre dans le cerveau est métabolisé par β -oxydation (Miller et al, 1987) ou encore que le métabolisme de l'octanoate, l'un des acides gras les plus abondants dans la circulation sanguine, constitue au moins 20% du métabolisme oxydatif cérébral (Ebert et al, 2003). Parmi les différentes populations cellulaires cérébrales, seuls les astrocytes peuvent métaboliser les acides gras par β -oxydation et ont une préférence pour l'utilisation des acides gras plutôt que des corps cétoniques ou du glucose comme source d'énergie (Edmond et al, 1987; Auestad et al, 1991; Edmond, 1992; Staub et al, 1995). Cependant, les astrocytes peuvent également produire des corps cétoniques à partir d'acides aminés à chaîne branchée (Bixel & Hamprecht, 1995). Il est à préciser que l'utilisation cérébrale des corps cétoniques et des acides gras comme substrat énergétique est également très importante au cours de la lactation, période durant laquelle s'opère un changement dans l'utilisation des substrats énergétiques, c'est-à-dire des corps cétoniques et des acides gras vers le glucose comme entre les périodes de jeûne et d'alimentation.

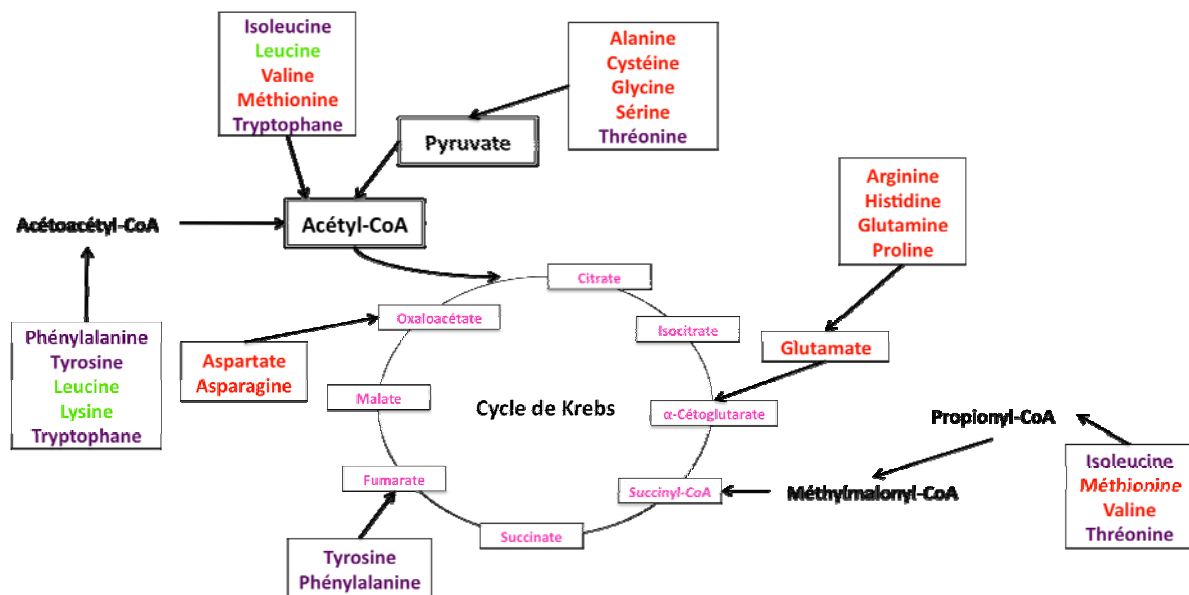


Figure 13. Représentation schématique du métabolisme catabolique des acides aminés protéinogéniques.

Les acides aminés (éléments constitutifs des protéines), apportent de l'énergie par leur oxydation. L'apport alimentaire en protéines n'excédant pas les 10 à 15% des apports journaliers de l'organisme en énergie, il ne s'agit pas de leur fonction première. Tant bien même, par leur oxydation mais aussi par leur caractère gluco- et/ou cétoformateur, les acides aminés peuvent représenter une source d'énergie supplémentaire en situation de jeûne. La dégradation des acides aminés commence par l'élimination de la fonction aminée menant à la formation d'un α -cétoacide. Ce squelette carboné se forme par réaction de désamination oxydative, de transamination ou encore de conversion. Certains des acides aminés sont : 1) cétoformateurs (en vert sur le schéma) et peuvent être utilisés pour former des lipides (en cas de régime hyperprotéique) ou des corps cétoniques; 2) d'autres glucoformateurs (en rouge), la plupart des acides aminés, avec la capacité de former du glucose par la voie de la gluconéogenèse via la formation de métabolites intermédiaires au cycle de Krebs ou de la voie de la glycolyse; 3) ou ont les deux propriétés (en violet) (Stipanuk, 2006).

serait à l'origine de leur sélection et donc utilisation par les organes (Hue & Taegtmeyer, 2009). Parmi les mécanismes sous-jacents à l'inhibition de l'oxydation du glucose par les acides gras, différents complexes enzymatiques sont impliqués, notamment l'activité du complexe enzymatique de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et celle de la 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) (Randle, 1998). Ces mécanismes ont tout d'abord été mis en évidence dans le cœur (Randle et al, 1963) puis dans le foie (Hue et al, 1988; Berry et al, 1993). Tandis que la PFK-1 intervient dans la phosphorylation du glucose au cours de la glycolyse, la PDH catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA reliant ainsi la glycolyse au cycle de Krebs. Les transporteurs de glucose sont également une cible des acides gras et interviennent dans ce processus. En effet, l'oxydation des acides gras entraîne une augmentation des ratios [acétyl-CoA/CoA] et [NADH/NAD⁺] qui vont inhiber le complexe enzymatique PDH. D'autre part, l'activité de la PDH est régulée par les 4 isoformes de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK1 à 4), elles mêmes stimulées par l'ATP, le NADH et l'acétyl-CoA et inhibées par l'ADP (adénosine diphosphate), le CoA-SH, le pyruvate et le NAD⁺ (Sugden et al, 2003). Ainsi, la phosphorylation de la PDH par les PDK diminue son activité, ce qui favorise l'utilisation des acétyl-CoA formés par β -oxydation des acides gras et l'épargne du pyruvate et du lactate, les deux étant des précurseurs glucogéniques. (Holness & Sugden, 2003). L'inhibition de la glycolyse au niveau de la PFK-1 ou de la capture de glucose via les transporteurs par les acides gras est relativement faible en comparaison de celle provoquée sur le complexe PDH. Il a été proposé que l'augmentation de la β -oxydation et les changements du statut redox intracellulaire associés mèneraient à l'accumulation de citrate dans le cytosol, qui, à son tour, inhiberait PFK-1, provoquant ainsi une augmentation des concentrations en glucose 6-phosphate et éventuellement une diminution de l'activité de l'hexokinase (Garland et al, 1963).

Il est important d'insister sur le fait que ces régulations ont été observées dans des tissus spécifiques (cœur et foie). Le rôle prépondérant de l'inactivation de la PDH dans le contrôle de l'utilisation du glucose par les acides gras a par exemple été remis en question au niveau musculaire (chez l'Homme), et une hypothèse alternative a été proposée (Roden et al, 1996) où il apparaît que dans ce tissu, l'oxydation des acides gras entraîne une diminution de la capture de glucose au moins deux fois plus importante que la diminution de la glycolyse. Ainsi les interactions inter-substrats comprises sous le concept du « glucose-fatty acid cycle » varient selon les tissus et les recherches doivent être poursuivies afin de continuer la caractérisation de ces interactions selon les tissus pour comprendre les mécanismes qui

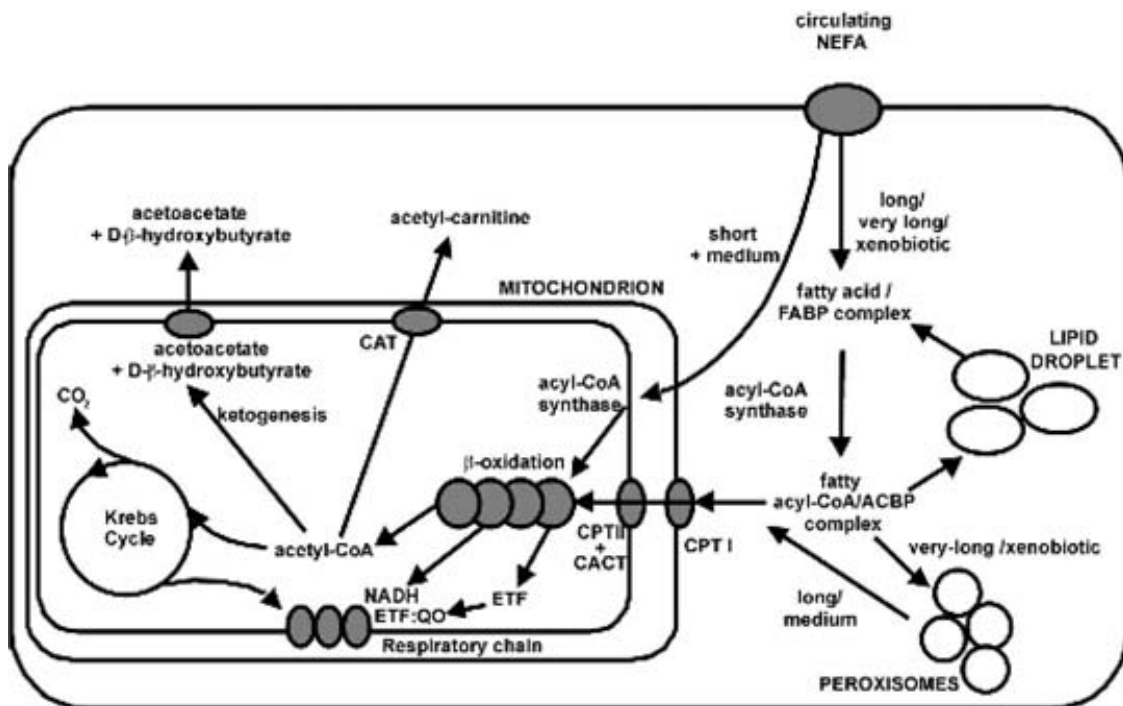


Figure 14. Flux généraux intra-cellulaire des acyl-CoA (Eaton, 2002)

En situation de jeûne, les taux circulants d'acides gras non estérifiés (AGNE) sont importants. Ces derniers sont repris par l'ensemble des cellules (exceptés les érythrocytes) et oxydés. Une fois dans la cellule, les AGNE sont activés en acyl-CoA par les ACS (Acyl-CoA synthase) en présence d'ATP et du coenzyme-A (CoA). Les acyl-CoA à chaîne courte et moyenne, par diffusion facilitée, intègrent la matrice mitochondriale où ils sont oxydés. Ceux à chaîne longue sont pris en charge par le système carnitine palmitoyltransferase qui comprend trois enzymes : la carnitine palmytoyltransferase I (CPT I), située dans la membrane externe de la mitochondrie et qui catalyse l'étape limitant la translocation des acides gras à longue chaîne dans la matrice mitochondriale, la carnitine-acyltranslocase (CAT) et la carnitine palmitoyltransferase II (CPT II), situées dans la membrane interne mitochondriale. Enfin, les acides gras polyinsaturés et à très longue chaîne (avec un nombre de carbones supérieur ou égal à 20) commencent leur β -oxydation dans les peroxysomes et la poursuivent dans les mitochondries une fois que leur chaîne atteint 18 carbones. À chaque cycle, la β -oxydation permet de retirer deux carbones à l'acide gras et de former une molécule d'acétyl-CoA, de FADH_2 et de NADH,H^+ suite à 4 réactions enzymatiques. Dans le cas d'acides gras insaturés, la β -oxydation nécessite l'intervention de deux enzymes supplémentaires (une isomérase et une réductase). Le dernier cycle de l'oxydation des acides gras à nombre impair de carbone forme une molécule d'acétyl-CoA et un résidu à trois carbones : le propionyl-CoA. Ce résidu est ensuite converti en succinyl-CoA, composé intermédiaire du cycle de Krebs. Le propionyl est le seul résidu de l'oxydation des acides gras à caractère gluconéogénique (Mayes & Botham, 2000). Quand le jeûne se prolonge, acides gras et acides aminés servent à la production de corps cétonique qui augmente dans les hépatocytes.

peuvent être impliqués dans la physiopathologie de certaines maladies. Par ailleurs, il existe une inhibition de la β -oxydation ainsi que de la cétogenèse par le glucose dont les évidences moléculaires ont été présentées dans les travaux de McGarry et al (McGarry et al, 1977) faisant intervenir le malonyl-CoA. Ces procédés seront abordés dans le paragraphe suivant.

Dans des conditions où le stress nutritionnel est important, l'inhibition de l'oxydation des carbohydrates par les acides gras est abolie (Goodwin & Taegtmeyer, 2000; Goodwin & Taegtmeyer, 1999; Hue & Taegtmeyer, 2009) et la forte demande énergétique est alors détectée par le senseur métabolique : « AMPK » (AMP-activated protein kinase) qui permet le maintien de l'homéostasie énergétique par toute une cascade de signalisation. L'AMPK est activée de façon allostérique par l'AMP et inhibée par l'ATP. Pendant le jeûne, le ratio intracellulaire AMP/ATP augmente et active l'AMPK (Carling, 2004), ce qui favorise les réactions métaboliques génératrices d'ATP (β -oxydation, glycolyse) et réduit les voies anaboliques consommatrices d'ATP (gluconéogenèse, synthèse des protéines, des acides gras et du cholestérol). L'AMPK, par phosphorylation de l'ACC (acetyl-coA carboxylase), inhibe les deux isoformes de l'enzyme (ACC1 et ACC2) (Wakil & Abu-Elheiga, 2009) et favorise la production d'énergie. Ces enzymes sont également régulées au niveau transcriptionnel par différents facteurs hormonaux (insuline, glucagon), de transcription (SREBP1c, liver-X-receptors, ChREBP) ou alimentaires (régimes riches en lipides, en glucides) qui agissent directement sur les promoteurs des gènes de ces enzymes. ACC1 permet d'augmenter la synthèse de triglycérides en catalysant la conversion de l'acétyl-CoA présent dans le cytosol en malonyl-CoA (acétyl-CoA lui même issu de la carboxylation du citrate produit par le catabolisme d'une molécule de glucose) (Figure 15). Sous l'action de la FAS (Fatty acid-synthase) et en présence de NADPH, le malonyl-coA conduira à la formation d'acides gras, qui serviront à la synthèse de triglycérides. ACC2 contrôle les taux de conversion du malonyl-CoA. Ce dernier inhibe l'activité de la CPT-I par régulation allostérique. Ainsi le malonyl-CoA joue un rôle important dans la régulation de la β -oxydation par l'inhibition de la CPT-I (McGarry et al, 1977) et la réduction de sa production en période de demande énergétique favorise l'oxydation des acides gras (Figure 15).

Ainsi l'homéostasie énergétique est finement régulée par une multitude de voies métaboliques et d'acteurs moléculaires de nature ou fonction différentes (hormonale, transcriptionnelle, enzymatique ou métabolique) qui agissent spécifiquement selon l'état nutritionnel et les organes en question. Toute dérégulation dans cette fine orchestration pourrait conduire au développement de pathologies. Dans les deux sections suivantes, nous

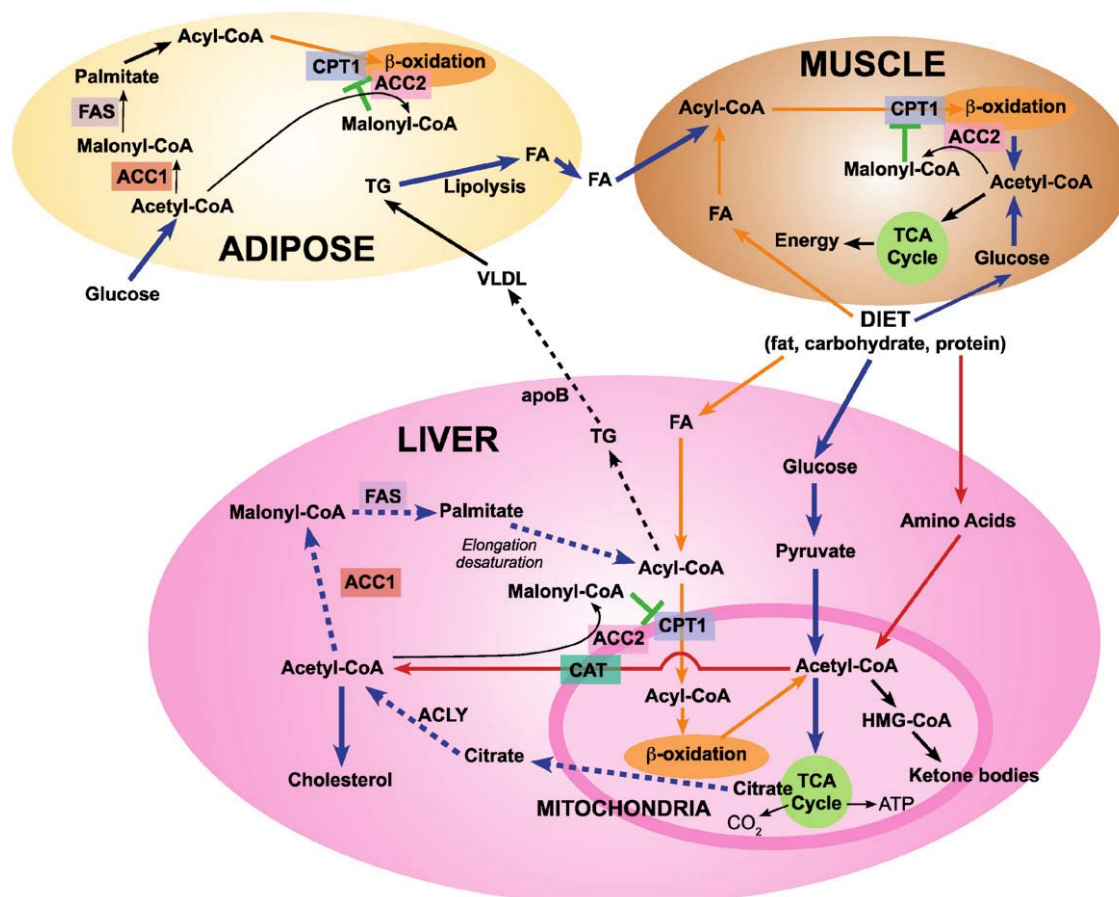


Figure 15. Représentation schématique des rôles distincts joués par l'acetyl-coenzyme A carboxylase 1 (ACC1) et l'acetyl-coenzyme A carboxylase 2 (ACC2) dans le métabolisme des lipides dans les tissus des mammifères (Wakil & Abu-Elheiga, 2009).

Les lipides, glucides et protéines alimentaires sont digérés et les acides gras (FA), le glucose et les acides aminés sont transportés vers divers tissus, incluant le foie, le tissu adipeux et le muscle. Dans le foie, le glucose suit la glycolyse ce qui conduit à la formation de pyruvate, ce dernier étant oxydé par les mitochondries suite à sa conversion en acétyl-CoA sous la catalyse de la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA est aussi produit par le catabolisme des acides aminés. Les acides gras sont activés en acyl-CoA, qui est conduit dans les mitochondries via la navette carnitine (CPT1) pour suivre la β -oxydation où sera formé de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA formé par la dégradation des nutriments est oxydé au travers du cycle de Krebs pour produire de l'énergie ou est converti en (1) citrate, qui passera dans le cytosol pour générer de l'acétyl-CoA via l'ATP citrate lyase (ACLY), ou en (2) corps cétonique, au travers du système hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), ou encore passe directement dans le cytosol (3) via la carnitine acétyl-CoA transférase (CAT). Dans le cytosol, l'acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA par l'ACC1 et utilisé via la FAS pour générer du palmitate qui est utilisé pour la synthèse de triglycérides (TG) et de VLDL. L'acétyl-CoA est carboxylé aussi par l'ACC2 au niveau de la membrane mitochondriale pour former du malonyl-CoA, qui inhibe l'activité de la CPT1 et réduit le transfert des acyl-CoA vers la mitochondrie pour leur β -oxydation. Il se passe des réactions comparables, avec des modifications adaptées, dans le tissu adipeux et le muscle.

verrons le cas de l'insulino-résistance et les mécanismes connus jusqu'alors dans la programmation périnatale qui tendraient à expliquer pourquoi les individus nés avec un petit poids pourraient être prédisposés à devenir intolérants au glucose ou même développer un diabète de type 2.

3.2 L'insulino-résistance et ses mécanismes.

La pathogenèse du diabète de type 2 implique à la fois une altération de la réponse à l'insuline et une baisse de sa sécrétion (Saltiel, 2001), cependant les mécanismes à l'origine de ces dysfonctionnements sont divers et la séquence exacte de ces altérations pose toujours question. La physiopathologie de l'insulino-résistance implique un réseau complexe de voies de signalisation activées par la liaison de l'insuline à son récepteur mais également par d'autres hormones ou métabolites qui pourraient interférer avec la signalisation de l'insuline et par conséquent atténuer son action. Ici nous passerons en revue les différentes fonctions de l'insuline et les altérations connues dans la signalisation de l'insuline qui peuvent constituer des éléments clefs dans le développement de l'insulino-résistance.

L'insuline, ses fonctions et sa cascade de signalisation;

L'insuline a un rôle satiétogène au niveau de l'hypothalamus (cf. section 2.2) mais ses fonctions sont bien plus étendues. Cette hormone peptidique est sécrétée en réponse à une augmentation des concentrations circulantes de glucose par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Dans de moindre proportions, certaines hormones telles que l'hormone de croissance, la prolactine, le glucagon like peptide-1 ainsi que quelques acides aminés comme la leucine (Sener & Malaisse, 1980) et l'arginine (un donneur d'oxyde nitrique) (Adeghate et al, 2001) stimulent également la sécrétion d'insuline.

La sécrétion de l'insuline entraîne une réduction des taux de glucose du fait que l'hormone inhibe la gluconéogenèse hépatique et stimule la capture de glucose au niveau du muscle squelettique, du tissu adipeux et du cœur, tissus dits insulino-sensibles (Taniguchi et al, 2006; White, 2003) assurant ainsi l'homéostasie glucidique. Ainsi, l'insuline régule la production de glucose en modifiant l'activité métabolique d'enzymes impliquées dans la gluconéogenèse et la glycolyse par la phosphorylation ou déphosphorylation de protéines et/ou par la régulation de l'expression de gènes codant pour ces enzymes hépatiques (Pilkis & Granner, 1992). D'une part, l'insuline inhibe l'expression de la transcription de la

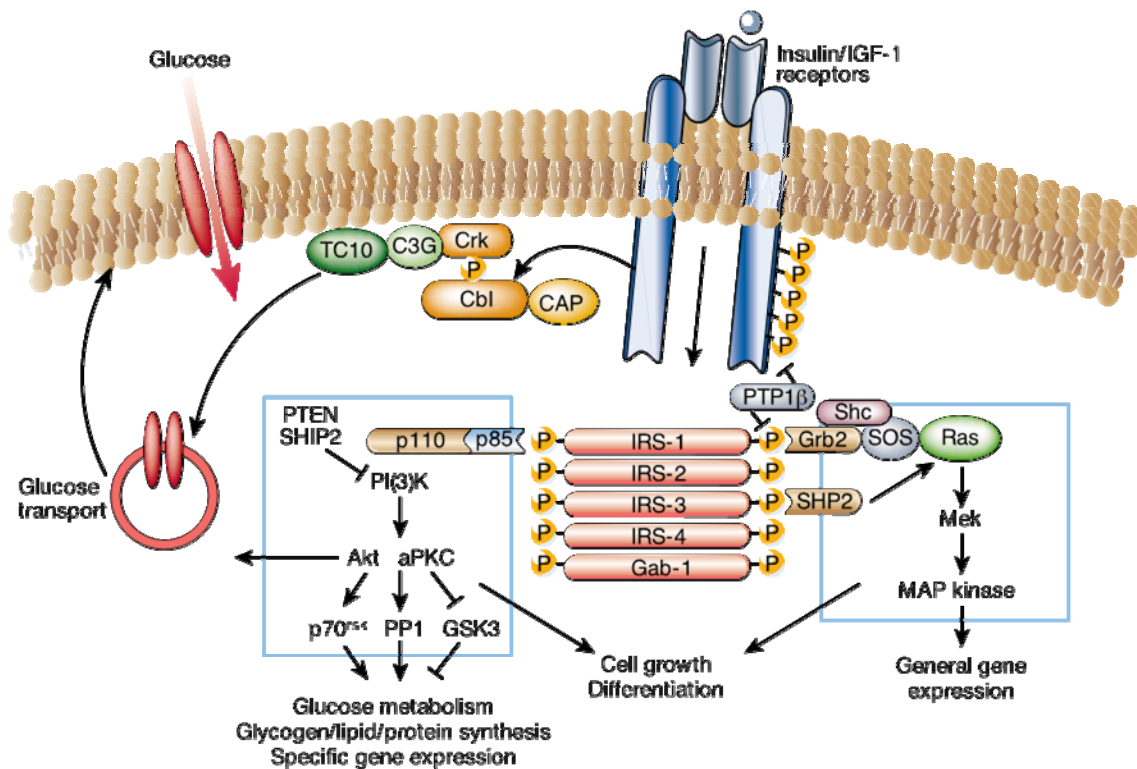


Figure 16. Les voies de transduction induites dans la signalisation de l'insuline (Saltiel & Kahn, 2001).

Le récepteur à l'insuline est une tyrosine kinase qui par sa liaison avec l'insuline s'auto-phosphoryle et catalyse ensuite la phosphorylation de protéines cellulaires telles que les membres de la famille des IRS, la Shc ou encore la Cbl. Suite à leur phosphorylation, ces protéines interagissent avec d'autres molécules de signalisation au travers de leur domaine SH2 qui entraînera l'activation d'une série de voies de signalisation dont celles de la PI3 kinase, la Ras avec la cascade de signalisation de MAP kinase et la Cbl/CAP avec l'activation de TC10. La sous-unité p85 de la PI3 kinase contient un domaine SH2 qui permet, entre autres, l'activation de Akt entraînant ainsi différents événements cellulaires tels que la synthèse de glycogène, l'inhibition de la gluconéogenèse et la stimulation de la capture de glucose (Könner & Brüning, 2012). L'ensemble des voies citées agit de façon complémentaire afin de coordonner la régulation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique par le biais de l'expression de gènes et de l'activation et de l'inactivation d'enzymes. En plus de réguler l'homéostasie glucidique, l'insuline intervient dans la croissance et la différenciation cellulaire.

phosphoenolpyruvate carboxykinase, enzyme limitante de la gluconéogenèse (Sutherland et al, 1996) et diminue l'expression des gènes codant pour la fructose-1,6-biphosphatase et la glucose-6-phosphatase. D'autre part, l'insuline régule l'expression de la transcription d'enzymes impliquées dans la glycolyse, induisant notamment une augmentation de l'expression de la glucokinase et de la pyruvate kinase. Une série de facteurs de transcription ou de co-facteurs tels que ChREBP (Carbohydrate responsive element binding protein), FOXO-1 (Forkhead box protein O-1) et PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α) sont également impliqués dans la gluconéogenèse. ChREBP est connu pour augmenter l'interaction de FOXO-1–PGC1 α conduisant à l'augmentation de la production de glucose hépatique (Herzig et al, 2001, Puigserver et al, 2003). Pour autant, les évidences augmentent également quant au fait que les protéines FOXO- soient impliquées dans la régulation de l'expression de gènes gluconéogéniques de façon insulino-dépendantes (Hall et al, 2000; Schmoll et al, 2000; Wolfrum et al, 2003). En effet, par l'induction de la phosphorylation de FOXO-1, l'insuline induit la rupture du complexe FOXO-1–PGC1 α (O'Brien & Granner, 1995; Hanson & Reshef, 1997) et empêche FOXO-1 d'entrer dans le noyau et d'activer la transcription d'enzymes contrôlant la gluconéogenèse. Ainsi, il résulte que la production de glucose est diminuée suite à la phosphorylation de FOXO-1 par l'insuline. En ce qui concerne la stimulation du captage du glucose dans les tissus insulino-dépendants par l'insuline, c'est au travers du transporteur GLUT4 et par transport passif que cela se déroule. L'activation de la voie PI3 kinase par l'insuline permet la translocation de GLUT4 à la surface cellulaire (Guma et al, 1995; Bryant et al, 2002) et augmente ainsi le transport intracellulaire de glucose. Ce transporteur est fortement exprimé dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le cœur (Mueckler, 1994).

En plus de ces différentes propriétés sur la production, la dégradation ou le transport de glucose, l'insuline induit le stockage des substrats énergétiques dans le tissu adipeux, le foie et les muscles par la stimulation de la lipogenèse, la glycogenèse et la synthèse des protéines (Kahn, 1994), ses taux circulants augmentant proportionnellement au poids corporel, en fonction de l'état nutritionnel et de l'activité physique d'un individu. Enfin, l'insuline inhibe la lipolyse, la glycogénolyse et la dégradation des protéines.

Au vu de toutes ces propriétés, l'insuline exerce une fonction anabolique en périphérie et sa régulation ainsi que sa signalisation sont de toute importance dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

La cascade de signalisation de l'insuline est induite par sa liaison avec son récepteur. Le récepteur à l'insuline (IR) est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités α et de deux sous-unités β liées par un pont disulphide. L'insuline se lie à la sous-unité α et active la tyrosine kinase de la sous-unité β de son récepteur (White, 1988). Une fois cette activation faite, cela permet l'autophosphorylation de la sous-unité β où la phosphorylation de trois résidus tyrosine (Tyr-1158, Tyr-1162 et Tyr-1163) est nécessaire à l'amplification de l'activité kinase. La cascade de signalisation comprend ensuite la phosphorylation de la tyrosine des substrats du récepteur à l'insuline (IRS) (Figure 16). Les études réalisées sur des souris knockout montrent que l'implication de tous les IRS n'est pas indispensable dans les processus d'insulino-sensibilité. Les souris IRS-1 knockout présentent une insulino-résistance dans les tissus périphériques et une intolérance au glucose associées à une croissance pré- et postnatale retardée (Tamemoto et al, 1994; Akaki et al, 1994). Les souris IRS-2 knockout montrent quant à elles une insulino-résistance dans les tissus périphériques ainsi que dans le foie mais ont une croissance altérée seulement dans certains tissus tels que le cerveau et le pancréas où la masse des cellules β est diminuée (Kido et al, 2000; Withers et al, 1998). Au contraire, les souris knockout IRS-3 et IRS-4 ont un métabolisme et une croissance normales ou proche de la normale (Fantin et al, 2000). Deux voies de signalisation sont principalement activées ensuite : la voie phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase) et la voie mitogen-activated protein (MAP) kinase (Figure 16).

Les mécanismes de l'insulino-résistance :

L'insulino-résistance associée à l'obésité et/ou au diabète de type 2 est caractérisée par un grand nombre de troubles où peut être associé tout un ensemble de voies métaboliques. De façon générale, l'insulino-résistance peut être définie par le fait que l'insuline soit incapable de maintenir l'homéostasie glucidique. Les principales caractéristiques cliniques d'une insulino-résistance sont une hausse de la production hépatique de glucose, en cas d'insulino-résistance hépatique et une baisse du captage du glucose suite à l'absence de réponse des tissus périphériques à l'insuline (Unger, 2002). Pour maintenir une homéostasie glucidique normale, dans un premier temps et à un stade pré-diabétique, les cellules β du pancréas vont augmenter la sécrétion d'insuline pour compenser l'insulino-résistance des tissus périphériques et/ou la hausse de production de glucose hépatique. Cependant, après épuisement des cellules β , l'homéostasie glucidique est altérée et un DT2M se développe ouvertement (Muoio & Newgard, 2008). Différentes altérations moléculaires ont été identifiées dans la physiopathologie de l'insulino-résistance parmi lesquelles : une diminution

des concentrations et de l'activité kinase du récepteur à l'insuline (Pessin & Saltiel, 2000), une diminution des concentrations et de la phosphorylation de IRS-1 et -2, une moindre translocation de GLUT4 et de son activité intracellulaire, une baisse de l'activité PI3-K due par exemple à un déséquilibre entre les sous-unités catalytiques et régulatrices de la protéine (Saini, 2010) ou encore une baisse de la phosphorylation de FOXO-1. Des altérations moléculaires sont connues à d'autres niveaux de la cascade de signalisation de l'insuline, cependant, les événements moléculaires à l'origine de ces altérations et menant au développement de l'insulino-résistance demeurent encore très mal identifiés.

Les acides gras font par exemple office de nombreuses recherches quant à la compréhension de leur implication dans le développement de l'insulino-résistance. Il a notamment été proposé qu'une augmentation de l'adiposité viscérale serait étroitement liée avec l'insulino-résistance chez des sujets masculins obèses non diabétiques et diabétiques (Miyazaki & DeFronzo, 2009). Plus particulièrement, les auteurs montrent dans cette étude que l'insulino-résistance musculaire est associée à une accumulation de masse adipeuse abdominale (viscérale et/ou sous-cutanée) alors qu'une insulino-résistance hépatique est davantage associée à une accréction adipeuse viscérale (Miyazaki & DeFronzo, 2009). L'hypothèse mécanistique face à cette dernière association, serait que par une faible densité en IR, entre autres, le tissu adipeux viscéral aurait une moindre sensibilité à l'action antilipolytique de l'insuline par rapport au tissu adipeux sous-cutané (Bolinder et al, 1983). Une hausse de l'accréction adipeuse à ce niveau entraînerait ainsi une augmentation du déversement d'AGNE dans la circulation portale. Un flux important d'AGNE dans la voie portale et donc vers le foie augmenterait alors la lipogenèse hépatique. Or il a été montré que les acides gras augmentent la phosphorylation des sérines des protéines IRS, ce qui provoque une diminution de la phosphorylation des protéines kinase des IRS et altère ainsi la transduction du signal de l'insuline (White, 2002). L'excès de triglycérides formés peut entraîner un dépôt ectopique de masse adipeuse au niveau du foie, du muscle squelettique, du cœur ou encore du pancréas. Au niveau du pancréas, il a été montré que les acides gras avaient une action lipotoxique. La notion de lipotoxicité désigne les effets délétères provoqués par une accumulation de dérivés des triglycérides dans divers organes (Lee et al, Unger, 1995). Ainsi, en plus d'interférer avec la signalisation intra-cellulaire de l'insuline, les intermédiaires de la formation de triglycérides (céramides, diacylglycérol) ou des acides gras activés en vu de leur dégradation (acyl-CoA), exercent un effet toxique sur les cellules conduisant à une dysfonction cellulaire et à l'apoptose des cellules telles que les cellules β du pancréas (Unger, 1995).

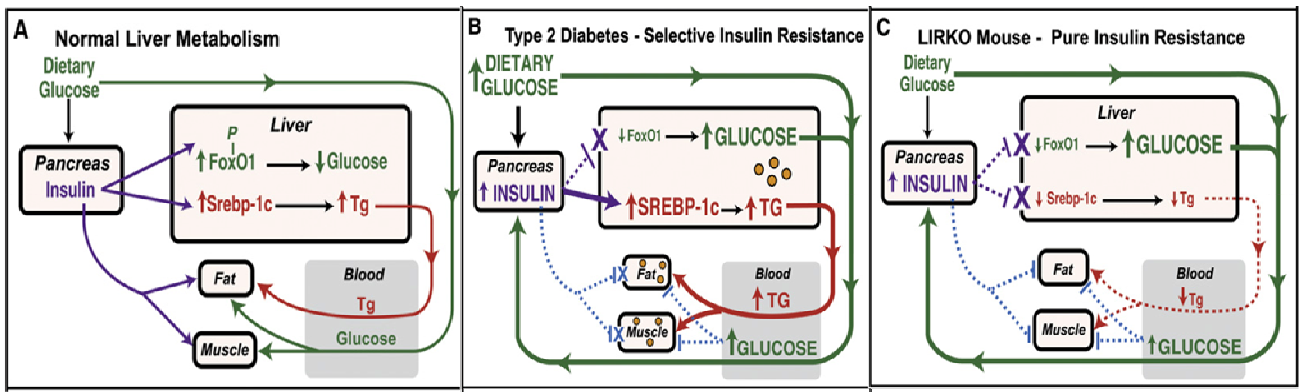


Figure 17. Modèle illustrant le paradoxe selon lequel l'insulino-résistance hépatique sélective produit des désordres métaboliques plus sévères qu'une insulino-résistance globale (Brown & Goldstein, 2008).

A) Réponse normale du foie à une charge de glucose. L'insuline mène à une diminution de la gluconéogenèse et à une augmentation de la synthèse des acides gras et des triglycérides (Tg).

B) Insulino-résistance sélective dans le foie de souris ayant un diabète de type 2. L'insuline échoue à entraîner une réduction de la gluconéogenèse mais continue de stimuler la synthèse d'acides gras et de triglycérides. Cela entraîne la combinaison fort délétère d'une hyperglycémie et d'une hypertriglycéridémie.

C) Insulino-résistance totale dans le foie de souris LIRKO (Michael et al, 2000). Les souris LIRKO sont knockout pour le récepteur à l'insuline et ce, spécifiquement dans le foie. L'insuline échoue à la fois à diminuer la gluconéogenèse et à augmenter la synthèse d'acides gras et de triglycérides. Ceci peut conduire à une hyperglycémie avec ou sans hypertriglycéridémie, un état physiopathologique qui pourrait avoir des conséquences moins sévères que celles observées avec une élévation combinée comme représentée dans le schéma B).

La pathogenèse de l'insulino-résistance est d'autant plus complexe du fait de son action paradoxale au niveau hépatique. Nous avons précédemment vu qu'en phosphorylant FOXO-1, l'insuline inhibait la gluconéogenèse. La seconde action de l'insuline dans le foie est d'activer le facteur de transcription SREBP-1c qui augmente la transcription de gènes tels que FAS et ACC, nécessaires à la biosynthèse des acides gras et triglycérides (Brown & Goldstein, 1997; Horton et al, 2002). De récentes études ont montré qu'il pouvait y avoir une insulino-résistance sélective, c'est-à-dire que l'action de l'insuline serait altérée dans l'une de ses fonctions au niveau hépatique mais pas dans la deuxième (Shimomura et al, 2000), ce qui pourrait avoir des conséquences métaboliques plus délétères qu'une insulino-résistance totale (Figure 17) (Brown & Goldstein, 2008).

Il reste encore une grande part d'incompréhension dans les mécanismes princeps de la mise en place de l'insulino-résistance. La consommation de régimes riches en lipides et/ou glucides tend à provoquer une surconsommation énergétique et est fortement associé au développement de maladies chroniques comme l'insulino-résistance. Pour autant les changements d'alimentation et d'hygiène de vie que connaissent nos sociétés ne suffisent pas à expliquer l'augmentation vertigineuse de la prévalence d'individus diabétiques et donc insulino-résistants.

3.3 Les évidences de la programmation du métabolisme énergétique.

Quelles relations avec le diabète de type 2 ?

L'insuline a un rôle clef dans la régulation du métabolisme énergétique (cf. section 3.2) et du comportement alimentaire (cf. section 2.2). Par conséquent, toute altération dans sa signalisation et/ou sa sécrétion pourrait prédisposer au développement de maladies chroniques comme le DT2M. L'origine de tels dysfonctionnements reste souvent inconnue. Les études réalisées sur des modèles de programmation métabolique par restriction protéique du régime maternel en période de gestation ou de gestation et lactation montrent que la descendance présente de nombreuses modifications sur le métabolisme énergétique et sa régulation. Cette descendance présente un risque plus élevé de développer à l'âge adulte une insulino-résistance voir un diabète de type 2. L'environnement nutritionnel précoce représente ainsi une composante essentielle dans la détermination de la santé future d'un individu. Dans les paragraphes suivant, nous verrons l'impact de l'insuline sur le développement des centres régulateurs de l'homéostasie énergétique du système nerveux et les conséquences d'un

environnement nutritionnel délétère en période périnatale sur le développement du pancréas, la fonctionnalité des mitochondries, ceci, en lien avec la physiopathologie de l'insulino-résistance.

Rôle de l'insuline dans la programmation :

L'insuline a une fonction déterminante dans l'homéostasie glucidique mais a également une activité sur la croissance et la différenciation cellulaire. Comme la leptine en période périnatale (cf. section 2.3), l'insuline exerce de nombreux effets développementaux sur le système nerveux central. En effet, il a été montré que l'insuline induit d'une part, une neurogenèse hypothalamique sur des neurosphères hypothalamiques en développement (Desai et al, 2011), d'autre part, permet l'élongation des prolongements neuronaux dans des cultures fœtales hypothalamiques (Schechter et al, 1999) et enfin, l'insuline modifie l'anatomie de divers noyaux hypothalamiques *in vivo* (Plagemann et al, 1999). Cette dernière observation a été montrée après l'injection directe d'insuline dans l'hypothalamus de rats de 8 jours de vie ce qui a entraîné une altération du développement d'aires hypothalamiques impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Cependant, même si quelques études montrent que l'insulinémie néonatale varie et que l'insuline exerce un rôle trophique sur l'hypothalamus (Plagemann et al, 1999; Toran-Allerand et al. 1988), l'influence des taux d'insuline périnatale sur la formation des réseaux neuronaux reste non étudiée.

Bien qu'il existe peu d'informations quant à l'influence d'une dénutrition protéique maternelle sur la neurogenèse et la formation des réseaux neuronaux, quelques études ont pu montrer qu'un tel environnement nutritionnel périnatal induisait au sevrage une hyperglycémie et une hypoinsulinémie chez la descendance, associées à une augmentation du nombre relatif de neurones hypothalamiques dans le PVN et le VMN (Plagemann et al, 2000). De plus, une hyperinsulinémie temporaire en période postnatale augmente la susceptibilité de développer un diabète de type 2 et de l'obésité à l'âge adulte (Plagemann et al, 1992). Enfin, les récepteurs à l'insuline étant fortement exprimés dans l'hypothalamus au moment de son développement (Kappy et al, 1984), un environnement nutritionnel périnatal délétère pourrait avoir une influence sur le nombre de récepteurs et diminuer ainsi les capacités neurotrophiques de l'insuline.

Programmation métabolique et insulino-résistance :

Les individus nés avec un petit poids induit par un retard de croissance intra-utérin présentent un risque 6 fois plus élevé de développer, au cours de leur vie, un DT2M que des individus

nés avec un poids normal (Hales et al, 1991). Les études réalisées sur un modèle rongeur de programmation métabolique par restriction protéique de la mère en période périnatale montrent que la tolérance au glucose est plus importante chez la descendance jeune, âgée de 6 semaines à 3 mois (Petry et al, 2000; Langley et al, 1994; Ozanne et al, 1996; Shepherd et al, 1997). Pour autant, la descendance mâle de ce modèle présente une perte, âge-dépendante, de la tolérance au glucose plus rapide que les individus contrôles. À 15 mois d'âge, ils ont une tolérance au glucose altérée (Hales et al, 1996; Ozanne et al, 2003) et à 17 mois, ils développent une insulino-résistance et un diabète de type 2 (Petry et al, 2001). Ce n'est qu'à un âge plus avancé (21 mois) que les femelles présentent une hyperinsulinémie et une tolérance au glucose altérée (Fernandez-Twinn et al, 2005).

Les études réalisées dans ce modèle montrent qu'il existe dès la naissance, chez cette descendance, une réduction de la masse des cellules β du pancréas (Snoek et al, 1990) associée à une diminution de la vascularisation du pancréas ainsi qu'un contenu et une sécrétion en insuline moindre (Boujendar et al, 2002; Petrik et al, 1999) que les individus contrôles. De plus, le taux d'apoptose rapporté chez les fœtus et nouveau-nés RCIU de ce modèle est plus élevé, ce qui contribuerait à la réduction de la masse de cellules endocrines (Boujendar et al, 2002; Petrik et al, 1999). Confirmant ces observations, une analyse protéomique réalisée sur les pancréas de ces nouveaux-nés a permis de mettre en évidence des modifications de l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire, le contrôle de la croissance et l'exocytose (Sparre et al, 2003).

Des évidences apparaissent également quant à l'altération de la fonctionnalité des mitochondries, véritable réservoir d'énergie de la cellule mais aussi source de la production d'espèces réactives de l'oxygène ou des espèces réactives de l'azote. Ces composés sont hautement destructeurs pour la cellule de part leur forte capacité à réagir et à endommager d'autres molécules intracellulaires comme les protéines, lipides et l'ADN (Barnes & Ozanne, 2011) ou pouvant même accélérer le raccourcissement des télomères (Von Zglinicki, 2002). Or, la descendance de mères nourries avec un régime hypoprotidique en période gestationnelle présente une production d'espèces réactives de l'oxygène plus importante et une capacité à produire de l'ATP réduite, ce qui altère, chez ces individus, les capacités sécrétoires à l'insuline des cellules β du pancréas (Simmons et al, 2005). Également, des changements métaboliques relatifs à la cascade de signalisation de l'insuline dans plusieurs tissus insulino-dépendants existent chez cette descendance (Ozanne et al, 2000; Ozanne et al, 1996).

Toutes ces altérations résultant de la programmation métabolique représentent un facteur de risque important pour le développement d'une insulino-résistance et d'un diabète de type 2 à l'âge adulte. De plus, il est important de noter que d'autres perturbations morphologiques s'ajoutent et augmentent d'autant plus ce risque chez les individus nés RCIU. En effet, les résultats issus du modèle de programmation métabolique par restriction protéique maternelle montrent également une diminution de la masse musculaire (Desai et al, 1996) ainsi qu'une adiposité abdominale (Ozanne et al, 1996; Shepherd et al, 1997 ; Petry et al, 2001) chez la descendance.

Conclusion de l'étude bibliographique et objectifs de la thèse

La régulation de la balance énergétique fait intervenir de nombreux facteurs dont la nature est variée et les interactions sont multiples et complexes. Les signaux périphériques véhiculés aux différents centres intégrateurs du cerveau, ainsi que l'orchestration par ces centres des comportements à adopter ou réponses métaboliques à générer, sont finement régulés pour maintenir l'homéostasie énergétique. Notre étude bibliographique confirme tout d'abord que l'environnement nutritionnel périnatal peut entraîner des modifications de la trajectoire de croissance du petit et notamment de sa trajectoire métabolique à un stade précoce. Ce premier chapitre montre également que ces modifications qui ont lieu en période périnatale, et qui résultent d'un environnement nutritionnel délétère, peuvent avoir des effets pérennes sur le comportement alimentaire et le métabolisme énergétique à l'âge adulte. La nutrition maternelle en période périnatale doit donc être adaptée afin d'assurer des croissances fœtale et postnatale optimales qui seront en adéquation avec l'environnement nutritionnel auquel sera exposé l'enfant puis l'adulte tout au long de son existence. Il ressort notamment des modèles d'étude de la programmation métabolique que l'exposition maternelle à une restriction protéique au cours de la gestation ou de la lactation prédisposerait la descendance à développer des maladies cardio-métaboliques dont l'obésité et le DT2M. Bien que certaines études apportent quelques éléments de réponse quant aux mécanismes impliqués dans cette reprogrammation métabolique et physiologique, le processus général mis en œuvre pendant les fenêtres de temps précoces reste en grande partie non caractérisé.

Au final, et en dépit du volume de connaissances actuelles sur ce sujet contemporain, relativement peu d'informations existent concernant l'impact d'une restriction protéique maternelle lors de fenêtres de temps périnatales spécifiques, sur la trajectoire métabolique précoce de la descendance et sur l'empreinte métabolique résultante à l'âge adulte, à des niveaux systémiques et en situation de régime équilibré ou déséquilibré, à l'image des habitudes alimentaires de nos sociétés. De même, l'impact de la restriction protéique maternelle sur la composition du lait reste très peu étudié tant au plan descriptif qu'explicatif. Or ce sujet représente un enjeu déterminant du fait que la période d'allaitement soit une cible médicale accessible tant en termes de prévention que d'intervention. De plus, bien que cela n'ait pas été évoqué dans la synthèse bibliographique, il a été démontré au travers d'études cliniques et expérimentales qu'un ralentissement de la croissance en période postnatale – suite

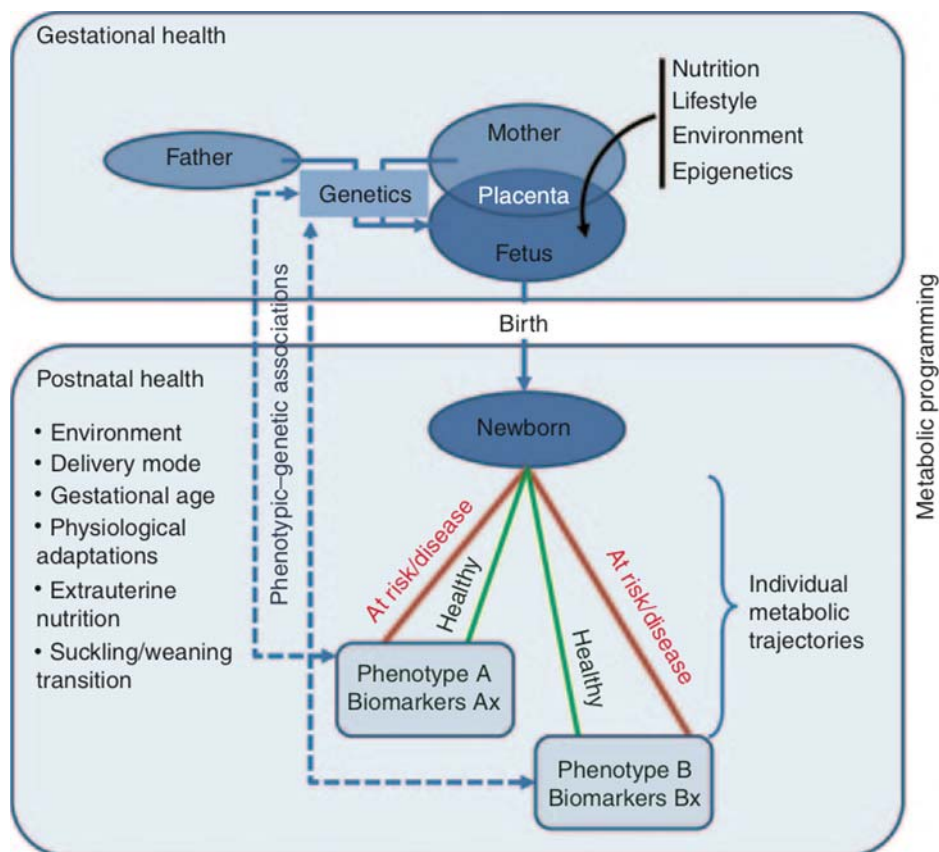


Figure 18. Modification de la trajectoire métabolique au cours de la programmation métabolique de la descendance et stratification des phénotypes associés (Moco et al, 2013).

La caractérisation de la trajectoire métabolique d'un individu de la naissance à la fin de la période d'allaitement et/ou jusqu'au moment de la transition alimentaire pendant le sevrage permettrait d'identifier des métabolites spécifiques menant à un phénotype donné. Ces métabolites permettraient alors de remonter dans les enchaînements de causalité à l'origine du phénotype observé et pourraient représenter des biomarqueurs métaboliques. Ces biomarqueurs seraient le reflet des événements biologiques relatifs au développement biologique gestationnel et de la vie postnatale. L'utilisation d'approches intégratives, telles que la métabolomique, permettrait d'identifier ces éventuels marqueurs spécifiques à un phénotype, lui-même résultant d'adaptations physiologiques dynamiques déterminées par la trajectoire métabolique précoce. Sur le long terme, la validation de ces biomarqueurs permettrait de stratifier des groupes phénotypiques associés à un patrimoine génétique. Cette stratification des phénotypes représente ainsi un espoir de santé et de soins nutritionnels en pédiatrie important qui permettrait d'intervenir dès le plus jeune âge auprès des individus à risque en se basant sur la trajectoire métabolique du nouveau né ou de son patrimoine génétique.

à l'exposition de la mère à un régime restreint en protéines – et en l'absence de RCIU, protégerait la descendance des altérations métaboliques et comportementales auxquelles font face les individus dont la trajectoire de croissance a été modifiée en période prénatale (cf. section 2.3 et 3.3). Ceci souligne l'importance et la spécificité des fenêtres de temps précoces sur la santé d'un individu. La nécessité d'étudier la composante lait et son impact sur le métabolisme de la descendance s'avère ainsi essentielle. Dans cette perspective, les principaux objectifs de ce travail de thèse ont été (1) de caractériser aussi finement que possible les modifications qui pouvaient intervenir au niveau du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique, d'un point de vue intégratif et à un niveau systémique à l'âge adulte; et (2) d'étudier précisément le rôle de la nutrition maternelle sur la qualité du lait et sur les trajectoires de croissance et métabolique de la descendance en période postnatale.

La difficulté à déceler les perturbations aux niveaux cellulaire et moléculaire réside notamment dans la complexité de l'organisation des réseaux métaboliques. Le développement et l'application d'approches plus intégratives, qui permettent une compréhension systémique et donc de mieux appréhender les processus métaboliques engagés, apparaît donc incontournable. Pour cela, en combinant l'utilisation d'approches ciblées conventionnelles et de phénotypage global de type métabolomique, nous visons une meilleure compréhension du système étudié à un instant « t ». La métabolomique est une approche méthodologique développée dans les années 2000 par Nicholson et son équipe, qui vise de façon générale à générer puis analyser un ensemble de descripteurs, d'un système biologique donné, à l'échelle du métabolome et donc en aval des processus intervenants aux niveaux génomiques, transcriptomiques et protéomiques. La métabolomique peut donc être considérée comme une approche de phénotypage chimique global, basée sur la détection des métabolites présents dans le système étudié et accessibles à l'analyse, notamment ceux de nature relativement polaire ($\text{Log Kow} < 3$) et de faible poids moléculaire ($\text{Mw} < 1000 \text{ Da}$). L'étude de ces métabolites, composés qui représentent l'interface finale entre la génétique et l'environnement auquel est ou a été exposé l'individu, ouvre ainsi de nombreuses perspectives en recherche et notamment en recherche pédiatrique (Figure 18). En effet, l'identification d'un grand nombre de métabolites dans un système donné permet de considérer un maximum de paramètres impliqués dans la régulation, les réactions et les produits du système. Ainsi, une telle approche est prometteuse en termes de compréhension des réseaux métaboliques et de leur régulation. Cependant, la métabolomique reste avant tout une méthode descriptive. C'est pourquoi la combinaison d'une telle approche intégrative à celle d'approches

méthodologiques plus ciblées et fonctionnelles représente un moyen original et plus robuste pour aller plus loin dans la compréhension du système étudié, tant d'un point de vue descriptif qu'explicatif. Afin de comprendre au mieux la physiologie associée à un phénotype ou comportement alimentaire donné dans le cadre de la programmation métabolique, nous avons fait le choix d'utiliser des outils méthodologiques variés et complémentaires à différents âges précoces ainsi qu'à l'âge adulte.

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement alimentaire et le métabolisme énergétique à l'âge adulte via différentes méthodes :

- en ce qui concerne le comportement alimentaire (article 1), nous avons associé au dosage biochimique d'hormones satiétogènes et à l'étude d'acteurs moléculaires impliqués dans la régulation du comportement alimentaire au niveau hypothalamique et à une échelle transcriptionnelle, un test de préférences alimentaires et des analyses en physiocages dans le cadre d'un régime standard de laboratoire ou d'un régime hypercalorique;

- pour aller plus loin dans la compréhension du métabolisme énergétique (article 2), nous avons combiné une étude métabolomique à des tests de sensibilité à l'insuline (test oral de tolérance au glucose, test de clamp hyperinsulinémique-euglycémique), aux profilages en acylcarnitines et en substrats énergétiques circulants, et à l'analyse des transcrits impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique au niveau hépatique;

- enfin, pour une meilleure caractérisation du phénotype face au comportement alimentaire et au métabolisme observés, nous avons étudié précisément la trajectoire de croissance pondérale postnatale et la composition corporelle par analyse aux rayons X.

Dans un deuxième temps, et dans l'objectif d'étudier plus finement les événements précoces qui pourraient aider à la compréhension des dérégulations observées à l'âge adulte, nous avons étudié plus précisément :

- l'impact d'un régime hypoprotidique sur la composition du lait (article 3). Pour cela nous avons analysé le lait d'un point de vue quantitatif global (protéine, glucide, lipide) et plus précis par l'étude de fractions mineures aux fonctions importantes (acides aminés libres, acides gras) ainsi que d'un point de vue qualitatif intégré par approche métabolomique. En parallèle, le phénotype et le métabolisme de la descendance ainsi qu'au sevrage ont été examinés;

- et pour aller plus loin dans la caractérisation des nouveau nés recevant le lait décrit au préalable (article 4 en préparation), nous avons étudié la trajectoire métabolique par

approche métabolomique intégrative et biochimique ciblée des ratons à plusieurs points de cinétique en période d'allaitement.

Chapitre 2 :

Résultats de l’empreinte nutritionnelle précoce sur la prise alimentaire et le métabolisme énergétique à l’âge adulte

Article 1:

Relative contribution of fetal and postnatal nutritional periods on feeding regulation in adult rats

A. Martin Agnoux, M.-C. Alexandre-Gouabau, G Le Dréan, J.-P. Antignac, P. Parnet

Publié dans Acta Physiologica

L'obésité représente aujourd'hui la plus grande menace de santé publique, sa prévalence ayant doublé depuis 1980 (Devaux & De Looper, 2012; Lameira et al, 2008). Cette augmentation marquée au cours de ces dernières années est d'autant plus préoccupante que 2,8 millions d'adultes décèdent chaque année des pathologies associées à l'obésité. En effet, 44% du diabète, 23% des cardiopathies ischémiques et de 7 à 41% de certains cancers sont attribuables au surpoids et à l'obésité (OMS, 2013). Bien que les facteurs génétiques soient importants dans le développement de l'obésité, l'incidence des mutations génétiques dans la prévalence de l'obésité mondiale ne permet pas d'expliquer la pandémie contemporaine (Froguel et al, 2000).

Dans ce contexte, un nombre important d'études épidémiologiques, cliniques et expérimentales a montré qu'il existe une relation entre un environnement nutritionnel fœtal délétère et l'accumulation de masse adipeuse à l'âge adulte (Hanley et al, 2010; Sullivan & Grove, 2010; Bieswal et al, 2006; Cottrell & Ozanne, 2008; Remacle et al, 2011; Palou et al, 2010). Ces données font suite au concept du « phénotype économe » (Thrifty phenotype) et le conforte. Il est proposé dans ce concept, décrit dans les années 90 par Hales et Barker, que les individus soumis à un environnement nutritionnel pauvre en calories pendant la période fœtale, seraient prédisposés à stocker de l'énergie plutôt qu'à l'utiliser dans leur vie adulte pour faire face à d'éventuelles nouvelles conditions de restriction énergétique (Barker et al, 1990).

D'autre part, les recherches actuelles ont mis en évidence l'importance de la nutrition périnatale dans le contrôle à long terme du comportement alimentaire (Cripps et al, 2005; McMillen et al, 2005). De plus, comme nous avons pu le voir dans la section 2.3 du chapitre 1, la mise en place des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire a lieu en période périnatale. Ainsi un environnement nutritionnel précoce délétère pourrait altérer durablement le développement des fibres neuronales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, ce qui pourrait avoir des répercussions à long terme sur l'intégration des

signaux de satiété ou de faim au niveau central et favoriser l'installation progressive de l'obésité. Nous avons également pu voir au cours de la synthèse bibliographique que l'exposition des mères à une restriction protéique pendant des fenêtres de temps spécifiques en période périnatale était déterminante quant aux conséquences physiologiques et métaboliques à long terme sur la descendance (Cottrell & Ozanne, 2008; Remacle et al, 2011; Ozanne et al, 2004, Zambrano et al, 2006). Actuellement, il existe très peu de données scientifiques décrivant avec précision le comportement alimentaire de cette descendance, selon que la trajectoire de croissance ait été modifiée au cours de la gestation et/ou de la lactation (Amarger & Parnet, 2013). Pour cela, les objectifs de notre première étude réalisée pendant les travaux de cette thèse, ont été : 1) d'évaluer plus précisément quelle période développementale est particulièrement sensible aux apports nutritionnels et influence le comportement alimentaire de la descendance, 2) en quoi des changements du comportement alimentaire de la descendance pourraient expliquer les dérégulations métaboliques observées, et 3) quels seraient les mécanismes sous-jacents.

Afin de répondre au mieux à ces objectifs, nous avons exposé des rates à une restriction protéique au cours des phases de gestation et de lactation, auxquelles nous avons attribué aléatoirement pendant la période d'allaitement des ratons qui étaient nés de ces rates exposées ou non à un régime hypoprotidique, comme décrit dans la figure 5 du chapitre 1. Nous avons procédé à la mesure de divers paramètres physiologiques tels que le suivi pondéral des animaux, le comportement alimentaire, la leptinémie et la composition corporelle *in vivo* à l'âge adulte.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la trajectoire de croissance postnatale des ratons selon leur croissance prénatale ainsi qu'à leur exposition à la leptine via le lait.

Ensuite, nous avons étudié les préférences alimentaires des animaux et l'organisation journalière des repas à savoir le nombre de repas, les quantités ingérées par repas, par jour et la vitesse d'ingestion dans le cadre d'un régime dit standard (ou de laboratoire), ou d'un régime de type « Occidental ». Les animaux ont été exposés à ce régime afin d'analyser le changement de comportement alimentaire en présence d'apports hypercaloriques.

Les mécanismes en amont et sous-jacents aux modifications du comportement alimentaire étant peu connus, nous avons analysé dans la dernière partie de cette étude l'influence de l'environnement nutritionnel précoce sur l'expression des neuropeptides impliqués dans les signaux de satiété ou de faim, ainsi que l'expression de molécules

impliquées dans la signalisation de la leptine ou de l'entérostatine, un peptide rattaché à la satiété spécifique des lipides.

Résultats marquants

Les résultats de cette étude, publié dans un journal de physiologie (*Acta Physiologica*), montrent que les altérations du comportement alimentaire et de sa régulation chez la descendance mâle adulte de rates nourries avec un régime hypoprotidique en période périnatale sont spécifiques aux trajectoires de croissance pré- et postnatale des rats.

Nos résultats amènent un nouveau regard sur le comportement alimentaire et sa régulation dans les modèles de programmation périnatale par restriction protéique maternelle. Notamment, nos données montrent que :

1) D'une part, les rats nés avec un RCIU, indépendamment de la vitesse de croissance postnatale, présentent une hyperphagie diurne lorsqu'ils sont exposés de façon chronique à un régime hypercalorique, ce qui pourrait refléter une baisse progressive de l'intégration centrale des signaux satiétogènes tels que la leptine. Ainsi, un RCIU pourrait induire une leptino-résistance en amont du développement d'une obésité. L'absence de diminution d'expression des gènes des neuropeptides orexigènes, comme observée chez les animaux contrôles lors de la consommation du régime hypercalorique d'une part, et les modifications de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation de la leptine d'autre part, s'inscrivent en cohérence et dans le prolongement de données antérieures issues de notre laboratoire qui montrent que les rats nés avec un RCIU développent une leptino-résistance au moins dès 5 mois d'âge (Coupé et al, 2012).

2) D'autre part, les rats ayant eu une croissance postnatale faible en l'absence de RCIU présentent une préférence alimentaire pour les régimes riches en graisses en adéquation avec l'hyperphagie observée suite à l'exposition prolongée à un régime riche en graisse et en sucre, qui pourrait s'expliquer par une diminution du contrôle central de la satiété aux aliments gras. Ceci est suggéré par la moindre expression du transcript de l'entérostatine au niveau hypothalamique et des récepteurs impliqués dans sa cascade de signalisation.

Ces modifications du comportement alimentaire et du métabolisme sont associées à un pic de leptine plus faible ou décalé dans le temps, ce qui, au regard de la littérature scientifique, pourrait contribuer à une altération de la mise en place des réseaux neuronaux

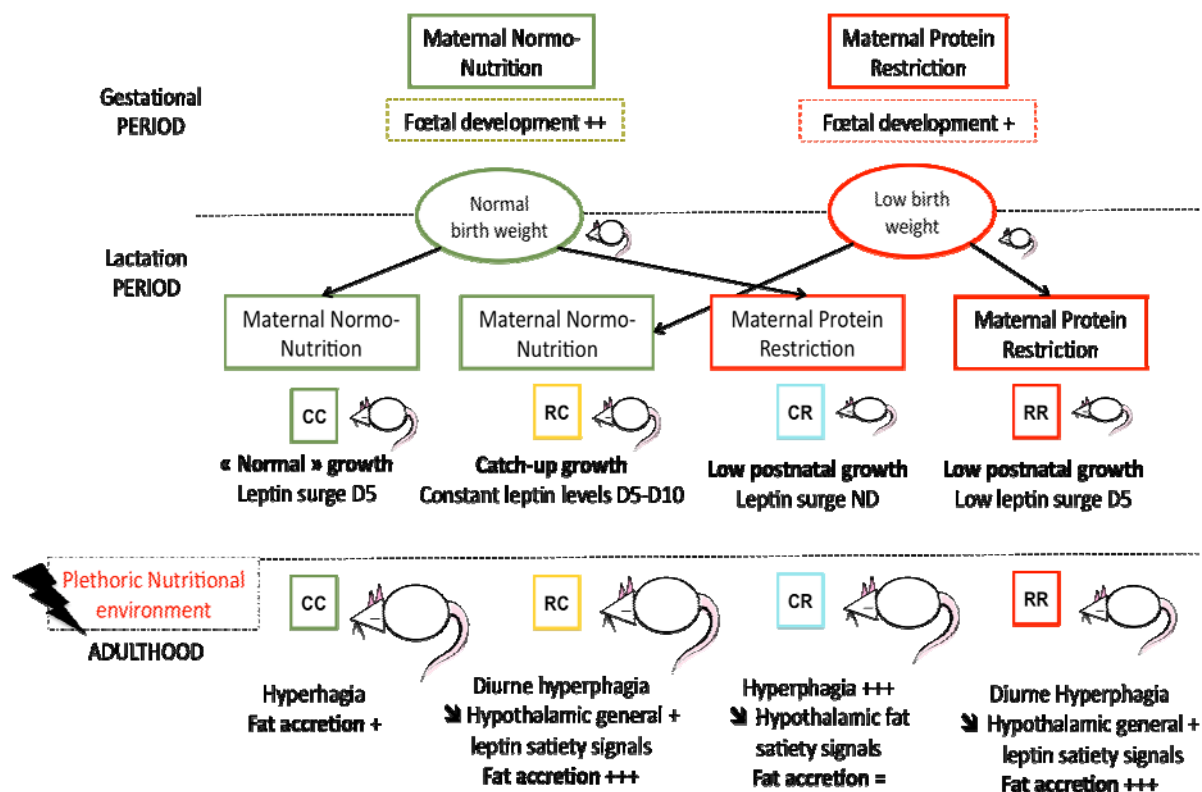


Figure 19. Schéma bilan des principales observations extraites de l'étude 1 sur le comportement alimentaire de rats adultes mâles ayant eu une modification de leur trajectoire de croissance pré- et/ou postnatale par modulation de l'apport protéique maternelle en période périnatale.

régulant l'homéostasie énergétique (non étudiée dans cette étude) et pourrait expliquer les réponses métaboliques et comportementales observées suite à l'exposition chronique à un régime hypercalorique.

Nos résultats concernant le métabolisme sont cohérents avec le phénotype économe observé chez des individus nés avec un RCIU qui présentent un risque plus élevé de développer des désordres métaboliques, notamment une accréction adipeuse et un gain de poids plus importants lorsqu'ils sont exposés à un environnement nutritionnel sur-optimal. Au contraire, les individus dont uniquement la croissance postnatale a été ralentie, ne présentent pas cette même réponse métabolique et sembleraient protégés de l'augmentation du statut pondéral et de l'adiposité provoquée par la consommation de régimes hypercaloriques.

En conclusion, au travers de cette étude nous amenons une vision plus complète de l'impact de la nutrition périnatale sur le comportement alimentaire à long terme et notamment sur l'organisation des repas et sur les préférences alimentaires selon les trajectoires de croissance pré- et postnatale (Figure 19). Les modifications observées sont renforcées par les différentes adaptations de la transcription de certains gènes hypothalamiques impliqués dans la satiété de façon générale ou spécifique, particulièrement celle des lipides, en réponse à l'ingestion chronique d'un régime de type Occidental. Ainsi, les périodes de gestation et de lactation représentent des fenêtres de temps clefs dans l'étude des mécanismes impliqués dans la mise en place de la régulation du comportement alimentaire mais aussi dans la compréhension de la physiologie des adaptations métaboliques qui peuvent être observées à l'âge adulte. Enfin, par les résultats présentés dans cette première étude, nous proposons quelques pistes en terme de mécanismes impliqués dans la programmation du comportement alimentaire et qui sont associés à une trajectoire de croissance périnatale donnée.

Relative contribution of foetal and post-natal nutritional periods on feeding regulation in adult rats

A. Martin Agnoux,^{1,2,3} M. -C. Alexandre-Gouabau,^{1,2,3} G. Le Dréan,^{1,2,3} J. -P. Antignac⁴ and P. Parnet^{1,2,3}

¹ INRA, UMR1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes, France

² Université de Nantes, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes, France

³ IMAD, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CRNH (Centre de Recherche en Nutrition Humaine), Nantes, France

⁴ LUNAM université, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), USC INRA 1329, Nantes, France

Received 19 April 2013,
revision requested 17 June 2013,
revision received 30 August 2013,
accepted 2 September 2013
Correspondence: P. Parnet, UMR
1280 Physiologie des Adaptations
Nutritionnelles, CHU Hotel Dieu
HNBI, Place Alexis Ricordeau,
F-44093 Nantes Cedex, France.
E-mail: Patricia.parnet@univ-nan-
tes.fr

Abstract

Aim: The aim of this study was to assess the contribution of both foetal and/or post-natal nutritional periods on feeding regulation in adult rats.

Methods: Body weight gain, adipose tissue development, food preferences and feeding pattern under regular chow or Western diets were characterized on four experimental groups of rats: pups born from protein-restricted dams (R) and weaned by control (RC) or R dams (RR) and pups born from control dams weaned by C (CC) or R dams (CR).

Results: Rats born with intrauterine growth restriction (IUGR) and fed a Western diet at adulthood appeared predisposed to body weight gain and more fat accretion, whereas CR rats, despite their preference for high-fat diet and their hyperphagia for Western diet, did not show significant increase in fat tissue. Daytime food intakes, as well as their speed of ingestion, were found modified in RC and RR. Alterations in the hypothalamic appetite regulatory mechanisms were investigated through neuropeptide expression analysis. IUGR rats showed altered expression of key elements of leptin and NPY signalling, while CR rats exhibited lesser expression of enterostatin, MC4r and HT-1Br mRNA.

Conclusion: Altogether, these results indicate that peri-natal nutrition has different lasting effects on feeding pattern and hypothalamic appetite regulation, depending on the time window insult.

Keywords feeding regulation, high-fat diet, leptin, metabolic programming, peri-natal nutrition.

Obesity and its related complications are a major public health concern of pandemic proportion in most of industrialized and emergent countries. The prevalence of obesity has more than doubled since 1980, and overweight affects around 20% of the world's adult population in 2008 (Devaux & De Looper 2012). Obesity results from a deregulation of the energy balance where multiple environmental, genetic and biological factors may have a contributory role (Keith *et al.* 2006).

Many epidemiological studies have indeed demonstrated that infants born small for gestational age (SGA) are more prone to develop obesity, hypertension and type 2 diabetes in adulthood (Ravelli *et al.* 1976, Barker 1990, 1995a,b, van der Sande *et al.* 2001). These observations have led to the concept of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) also known as the Barker's hypothesis. This hypothesis proposes that adverse environmental conditions during

specific windows of early development can have lasting effects on cell fate, organogenesis, metabolic pathways and physiology, thereby impacting lifelong physical, metabolic and mental health. Over the last decade, several pieces of evidence, supporting the nutritional programming component of metabolic disorders, have been accumulated from different clinical and experimental studies, conducted in several animal species (Jones *et al.* 1984, 1986, Fernandez-Twinn & Ozanne 2010, Sullivan & Grove 2010). The offspring of dams exposed to nutrient restriction during pregnancy and/or lactation was then reported to exhibit several physiological alterations linked to metabolic syndrome such as insulin resistance (Plagemann *et al.* 2012), reduced leptin sensitivity (Vickers & Sloboda 2012) and hyperlipidaemia (Bieswal *et al.* 2006, Desai *et al.* 2007).

Lactation, in addition to *in utero* period, also appears as a sensitive time window during which nutritional insults can lead to the programming of adult metabolism. Indeed, overnutrition during lactation is associated with obesity, insulin resistance and premature death in offspring rats (Ozanne & Nicholas Hales 2005). At the opposite, maternal protein or caloric restriction during lactation only does not cause obesity and may even protect the offspring to develop obesity when fed a high-fat diet (Ozanne *et al.* 2004, Zambrano *et al.* 2006, Palou *et al.* 2011).

Hypothalamus is one of the main brain regions involved in the regulation of feeding control and energy expenditure (Morton *et al.* 2006, Cota *et al.* 2007, Grayson *et al.* 2010). Hypothalamic neurones develop in pre-natal period, but become functional only after the full development of their projections to other hypothalamic nuclei at the end of the third post-natal week (Bouret *et al.* 2004a,b). Thus, impaired peri-natal development of appetite neuronal circuitry could have long-term effects on homeostatic regulation of energy balance. Indeed, the peri-natal period has been demonstrated as a critical period for the programming of appetite in young and adult animals and particularly in rodent (Langley-Evans *et al.* 2005, Coupe *et al.* 2009, Palou *et al.* 2010, Sutton *et al.* 2010). An increase in fat accumulation and higher sensitivity to high-fat diet in adult offspring (Ozanne & Nicholas Hales 2005) were correlated with abnormal early development of hypothalamic circuitries in rodent model of peri-natal maternal protein restriction (Coupe *et al.* 2010). The establishment of these neuronal pathways takes place under the control of neurotrophic factors (leptin, insulin, BDNF or IGF-1). The presence of a circulating leptin surge during post-natal life appears to be required for brain and appetite circuitries development of newborn rats (Bouret *et al.* 2004b), although the origin of that leptin is still controversial.

Hedonic aspects of food intake can drive the feeding behaviour, overriding normal requirements of daily energy needs to meet normal body weight (BW) homeostasis. Indeed, highly palatable diet, that is, food rich in fat and/or sugar, is known to disturb the energy homeostasis by blunting the response to satiety signals (Erlanson-Albertsson 2005). Some satiety signals have been identified to regulate the appetite for specific macronutrients. Among them, enterostatin (a pentapeptide) secreted by the pancreas and the stomach (Sorhede *et al.* 1996) and recently found to be secreted by the brain (York *et al.* 2006) is involved in fat satiety (Erlanson-Albertsson *et al.* 1991). Because it has been shown that maternal nutrition may promote changes in offspring perception of palatability and food preferences (Langley-Evans *et al.* 2005, Palou *et al.* 2010), alteration in enterostatin secretion and/or signalling could participate in feeding control anomalies.

Therefore, we hypothesized that peri-natal maternal nutrition and the time window insult, that is, gestation and/or lactation periods, would promote different changes in offspring hypothalamic control of appetite that could participate to metabolic adaptation. To decipher early mechanisms of deregulation of feeding behaviour and food preferences, we studied (i) food intake pattern of chow and Western diet into adulthood, (ii) alterations in the hypothalamic appetite regulatory mechanism and satiety signals implicated in high-energy intake through neuropeptides expression analysis, (iii) growth and fat development during lactation and after chronic exposure to palatable diet and (iv) milk leptin contribution to pups leptin surge.

Material and methods

Ethics statement

Animal maintenance and all experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of November 24th 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures and were approved by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Paris, France). Animal facility was approved by the French Veterinary Department and was registered under the number A44276. The experimental protocol was registered under the number CEEA.2011.4.

Animal experiments, housing and diets

We used an established model of metabolic programming previously used and described (Coupe *et al.* 2009, 2010). Briefly, virgin female Sprague Dawley rats of 8 weeks old weighting 200–250 g were

obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France), conventionally housed in an animal room in a constant temperature (20–22 °C) and humidity (50–60%) and placed under a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:30) with free access to food (A04, SAFE, Augy, France) and water. After 15 days of habituation, females were mated overnight with males of 7 weeks of the same strain (2 females for 1 male). After confirmation of mating by visualization of spermatozoa, dams were housed individually and fed either a control (20 g of protein/100 g of food-C, $n = 25$) or an isocaloric low-protein diet (8 g of protein/100 g of food-R, $n = 25$) through gestation and lactation. Both diets, previously used with success (Snoeck *et al.* 1990, Fanca-Berthon *et al.* 2009), were purchased from Arie Blok (Woerden, the Netherlands), and composition is provided in Table S1. The dams food intake was recorded during gestation and lactation as presented in the additional data (Figure S2). At gestation day 5, the R dams ate significantly more than the C dams, whereas at days 8, 12 and 19, no differences were measurable. Concerning food intake during lactation, significant difference was measured between the C and R dams because R dams consumed significantly less after day 5. In no case we found that the protein-restricted diet increased food intake.

Low-protein diet leads to the delivery of low-birth-weight pups as described previously (Fanca-Berthon *et al.* 2009). At delivery, litter size was adjusted to eight male pups per dam. Pups were pooled from different litters and were randomly attributed to foster mothers to create four experimental groups. Pups born from protein-restricted dams (R) were attributed to C dams (RC group) or to R dams (RR) for lactation. Pups born from control dams were randomly adopted by C dams (CC) or R dams (CR). At weaning (21 days), all male pups were housed individually and fed a control protein diet containing 20% protein. Then, from the age of 40–164 days, rats were fed a standard laboratory chow diet (A04, SAFE, Augy, France) containing 16% protein. Afterwards, they were split in two groups, one maintained on chow and the second fed on a Western diet (WD), containing 17% protein, 43% carbohydrate and 41% fat (Research diet, New Brunswick, NJ, USA) for 10 weeks (Table S1). The study design is summarized in Figure 1.

Milk samples

Milk samples were collected from 32 lactating dams (C, $n = 16$; and R, $n = 16$) at 1, 9, 14 and 18 days of lactation as described by Grigor *et al.* (1986). Briefly, pups were removed from their mothers for 2 h before milk was collected. Dams were anesthetized with 2–2.5% of isoflurane for 1.5 L min⁻¹ of oxygen and

treated with an intraperitoneal injection of oxytocin (1 unit of Syntocinon; Sigma-Tau, Ivry sur Seine, France) to stimulate milk ejection that was obtained twenty minutes later by massaging the nipples previously shaved. 0.5–1.5 mL of milk was collected from each dam and immediately frozen at –80 °C.

Food self-selection test

Food preferences were analysed by self-selection between chow, high-saccharose or high-fat diets (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France, Table S2) with a respective ratio power diet/water of 1 : 0.43; 1 : 0.36 and 1 : 0.39. Diets were presented for a consecutive period of 20 days, to 4-month-old rats ($n = 5$ animals/group). After a period of habituation to eat from glass cups, three different fresh diets were offered daily and weighted every morning. The place of the cups in the home cage was changed every day to avoid a home place selection. Each diet was coloured by food colourant to quantify spillage. The food intake was expressed as kcal/d/kg of body weight.

Measurement of body weight and food intake

Pups BW was recorded at birth then every morning until weaning. After weaning and until the end of the experiment, rats and their 24-h food intake were weighted twice a week.

Meal pattern analysis

After 6.5 weeks of chow or WD, 203-day-old rats (4–6 animals/group) were housed for 3 days in Plexiglas cages equipped to monitor meal patterns by means of continuous automatic weighing of the food cups and the water disposal in Phecomp cage (Bioseb, Vitrol, France). Meal pattern was recorded on the second and third days each 5 s on a 24-hr period. Means between both days were used to determine the exact feeding pattern as follows: a meal needed to be larger than 0.1 g and longer than 10 s and two distinct meals needed to be separated by an interval ≥ 10 min (Castonguay *et al.* 1986, Coupe *et al.* 2011). With these filters, parameters characterizing feeding pattern as relative day and night food intake, ingestion rate, relative meals size and meals number were obtained.

Blood, brain and body fat mass collection

Special care was taken to perform killing at the same period of the day (8 a.m to 12 a.m.) to prevent the bias due to circadian variations in metabolic expression. Killing was performed at day (D): 0-5-10-16-20 by decapitation. At day 234, they were fasted for

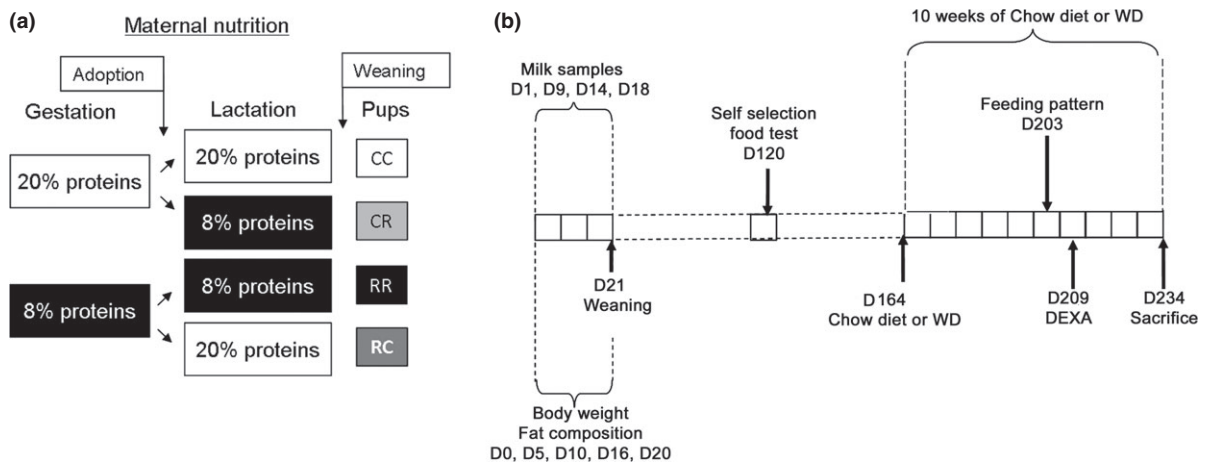


Figure 1 (a) Schematic diagram of the study design. Four groups of rats were obtained and studied from birth to adulthood. (b) Time schedule used to monitor physiological parameters and body composition. C: Control, R: restricted, D: day, WD: Western diet, DEXA: dual-energy X-ray absorptiometry.

15 h before euthanasia using a rising concentration of CO₂ followed by decapitation. Blood was collected from trunk in pups and heart in adult rats in tubes with EDTA (Pfizer-Centravet, Plancoët, France) and centrifuged at 2500 g for 15 min at 4 °C. Plasma was collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until subsequent analysis. After removing the brain from the skull, hypothalamus was dissected according to Paxinos' atlas (Paxinos & Watson 2005) on an ice tray, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Bilateral fat pads from three regions (retroperitoneal, peri-renal and epididymal) were dissected, weighted and summed to obtain the total visceral white adipose tissue mass.

Body composition

In adulthood, after 7.5 weeks of Western diet, animals were anesthetized with Dorbene vet (20 µg kg^{–1}, Pfizer-Centravet, Plancoët, France) and analysed by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) by Atlantic Bone Screen platform (Nantes, France) to assess total white adipose tissue.

Biochemical analysis

Leptin concentration was determined with specific rat leptin ELISA kits (LINCO Research kit, Millipore, St Charles, MO, USA) at each kinetic time point on 10 µL plasma and milk samples (Bautista *et al.* 2008). Detection limit of the ELISA was 0.5 ng mL^{–1}.

RNA isolation and Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from snap-frozen hypothalamus using TRIzol reagent according to the manufacturer's

instructions (Ambion RNA, Life technologies, Saint Aubin, France). The quality was checked on agarose gels, and the RNA concentration was determined by measuring the UV absorbance 260/280 nm. cDNA was prepared from 2 µg of RNA sample using oligo (dT) and Moloney murine leukaemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) in a final volume of 25 µL and 'Perlprimer' program (version 1.1.17) and synthesized by Eurogentec (San Diego, CA, USA, Table S3).

Real-time PCR was performed on 5 µL of a 1 : 40 dilution of cDNA and 2.5 µM of both forward and reverse primers in a final volume of 15 µL, using SYBER green PCR kit (Eurobio, Eurobiomix, France) in the iCyclerIQ[®] real-time PCR detection system instrument (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). mRNA expression was calculated using the 2^{–ΔΔC_t} method after normalization with β-actin used as the reference gene (Livak & Schmittgen 2001). CC, RC, RR and CR groups under chow diet were the calibrator groups for CCWD, RCWD, RRWD and CRWD groups respectively.

Statistical analysis

Biochemicals, anthropometrics and food pattern data were expressed and presented as mean ± SEM in tables and as median [minimum-maximum] in figures. Differences among groups were determined using Mann–Whitney *U*-test with GraphPad Prism, version 5.00 (La Jolla, CA, USA).

Spearman correlation was used to analyse the relation between dams milk leptin and offspring circulating leptin levels.

Data from the self-food selection pattern were analysed by an unsupervised method, the principal component analysis (PCA), using SIMCA-P[®] software

(version 12, Umetrics Inc., Umeå, Sweden). The contribution of the tested diets in this distribution was evaluated by a supervised partial least square discriminant analysis (PLS-DA), combined with a multi-variate pre-processing correction called orthogonal PLS-DA (OPLS) previously described by (Trygg *et al.* (2007). In all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Offspring growth

Maternal protein restriction during gestation led to intrauterine growth restriction (IUGR) reflected by a lower BW at birth (R: 6.59 ± 0.61 g, $n = 526$, vs. C: 7.08 ± 0.60 g, $n = 584$, $P = 0.0001$), but had no effect on litter size (13 pups per Litter). IUGR offspring suckled by dams fed a low-protein diet (RR) remained lower than CC until day 234 ($P < 0.05$), but they reached CC rats weight at 6 days of age when suckled by normally fed dams (RC) (Fig. 2). Conversely, control offspring cross-fostered by mothers fed the low-protein diet (CR) were growth-restricted during lactation period and were significantly lighter than CC by days 6–234 ($P = 0.0122$; Fig. 2), but were not different of RC offspring from days 128–234 ($P > 0.05$) (Fig. 2).

Plasma leptin and adipose tissue mass in offspring and milk leptin

Leptin concentration in dams milk varied according to diet and lactation day (Table 1). Milk from R dams was significantly less concentrated in leptin than C milk at D1 and D14.

Plasma leptin concentration was measured in offspring at different stages of lactation (D0, 5, 10, 16 and 20) (Fig. 3a). Globally, RR rats showed lower plasma leptin concentration compared with CC and

RC rats, and the same was observed at the two time points available for CR rats.

At birth, leptin concentrations were below the limit of detection for all groups. At D5, leptin concentration was found lower in RC and RR pups compared with CC pups (no values for CR). CC and RR pups showed a leptin surge at D5. In contrast, RC pups showed a stable level through the two first weeks of lactation and a significantly higher leptin concentration than the other groups at D20 (Fig. 3a). There was no correlation between leptin level in dams milk and leptin in pups plasma.

At D20, leptin concentration was consistent with increased relative adipose tissue mass (Fig. 3b). RC had similar relative fat pad mass than CC, whereas RR and CR had significantly lower relative adipose tissue than CC and RC from the 16th day. At D20, CR had smaller fat accretion than RR.

Self-food selection

Four-month-old animals were tested for food preferences by self-selection of chow, high-saccharose or high-fat diets. To analyse specifically food preferences and avoid election due to food novelty, only data obtained for the last 10 days of the 20 days of experiment were taken into account. The PCA of the quantity of diet (g/day/kg body weight) eaten by each animal at each test day showed a very good clustering of the animals in regard to their peri-natal growth trajectory: CC, RC, RR and CR rats demonstrated a distinct feeding behaviour under chow (Fig. 4a), high-saccharose (HS, Figure S2A) and high-fat (HF, Figure S2B) diets.

The loadings of the OPLS-DA model performed on three variables (i.e. diets) for the four groups, revealed that CR had a strong preference for high-fat diet, CC for high-saccharose diet, RR for chow diet, whereas RC did not show any food preferences between the three proposed diets (Fig. 4b). In addition, CR rats had higher relative energy intake (Table 2).

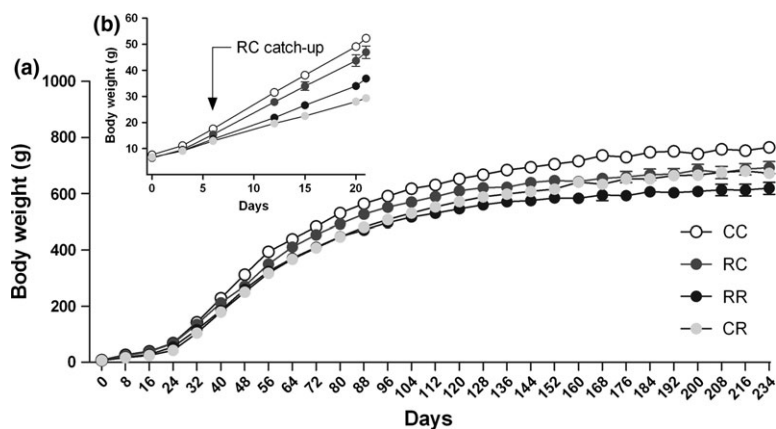


Figure 2 Weight gain pattern: (a) body weight (g) from birth to post-natal day 234 for CC (10), RC (10), CR (10) and RR (10) male offspring. Values are mean $\pm$ SEM. (b) Body weight (g) from birth to post-natal day 21.

Table 1 Leptin concentration in dams milk and correlation with leptin from pups

Milk leptin (ng mL ⁻¹)	D1 (<i>n</i> = 12–14)	D9 (<i>n</i> = 6)	D14 (<i>n</i> = 13–16)	D18 (<i>n</i> = 15)
C	7.86 ± 0.37 ^a	7.57 ± 0.26 ^a	3.97 ± 0.37 ^b	7.79 ± 0.58 ^a
R	6.26 ± 0.26 ^{a**}	8.27 ± 0.49 ^b	5.08 ± 0.32 ^{c,*}	7.11 ± 0.20 ^d
Correlation R ² between milk leptin and plasma leptin pups				
CC	nd	0.40	0.38	0.54
RC	nd	0	0.61	0.26
RR	nd	–0.20	–0.14	–0.14
CR	nd	nd	–0.50	0.08

Means with different letters are significantly different at 5% for one group of dams and throughout lactation.

The symbols * and ** indicate significant difference between R and C dams with $P < 0.05$ or $P < 0.01$ respectively. nd, not detectable.

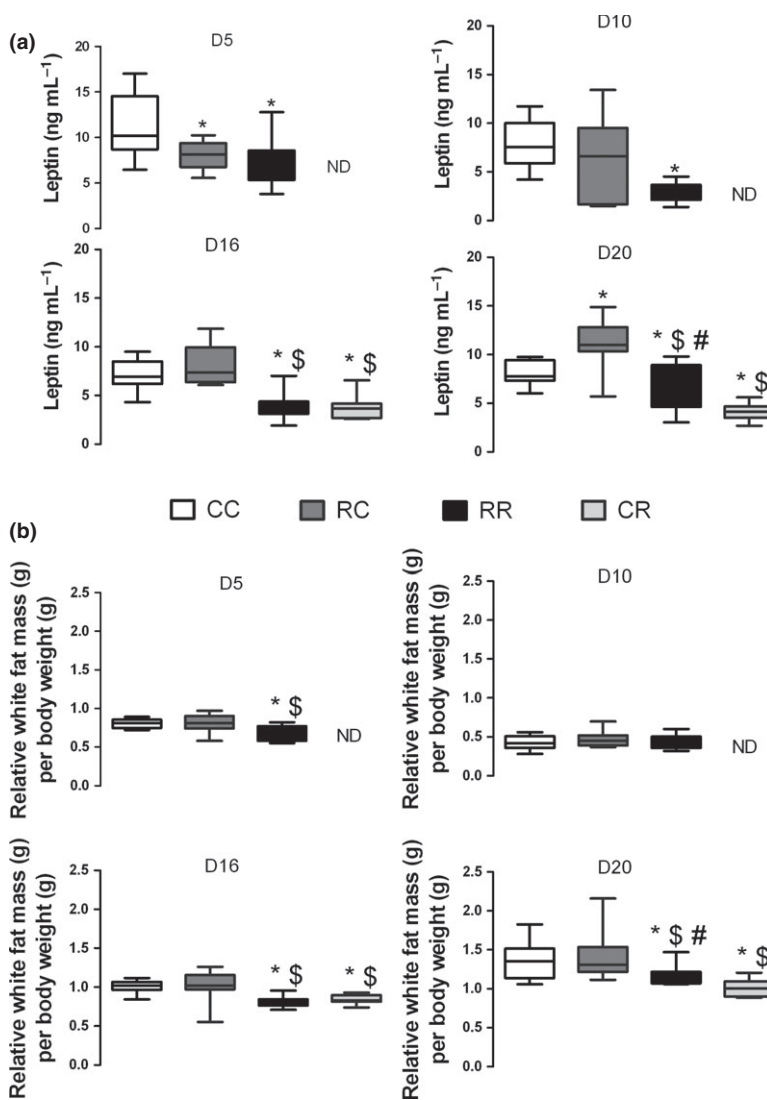


Figure 3 (a) Plasma leptin concentration (ng mL⁻¹) for CC (10), RC (10), CR (8) and RR (10) male offspring from birth to post-natal day 21. (b) Relative fat mass for CC (10), RC (10), CR (8) and RR (10) male offspring as the sum of retroperitoneal, peri-renal and epididymal bilateral fat pads (g)/body weight (g), from birth to D21. Values are medians [minimum-maximum]. * vs. CC offspring, $P < 0.05$; \$ vs. RC offspring, $P < 0.05$; # vs. CR offspring, $P < 0.05$.

Western diet sensitivity into adulthood

Metabolic response. RR rats fed a standard chow diet demonstrated a lower BW gain measured from

day 164 to day 234 and a lower relative adipose tissue weight than CC rats (Table 3) also visible for RC rats (trend for BW gain, $P = 0.08$). When given unlimited access to Western diet, RRWD and

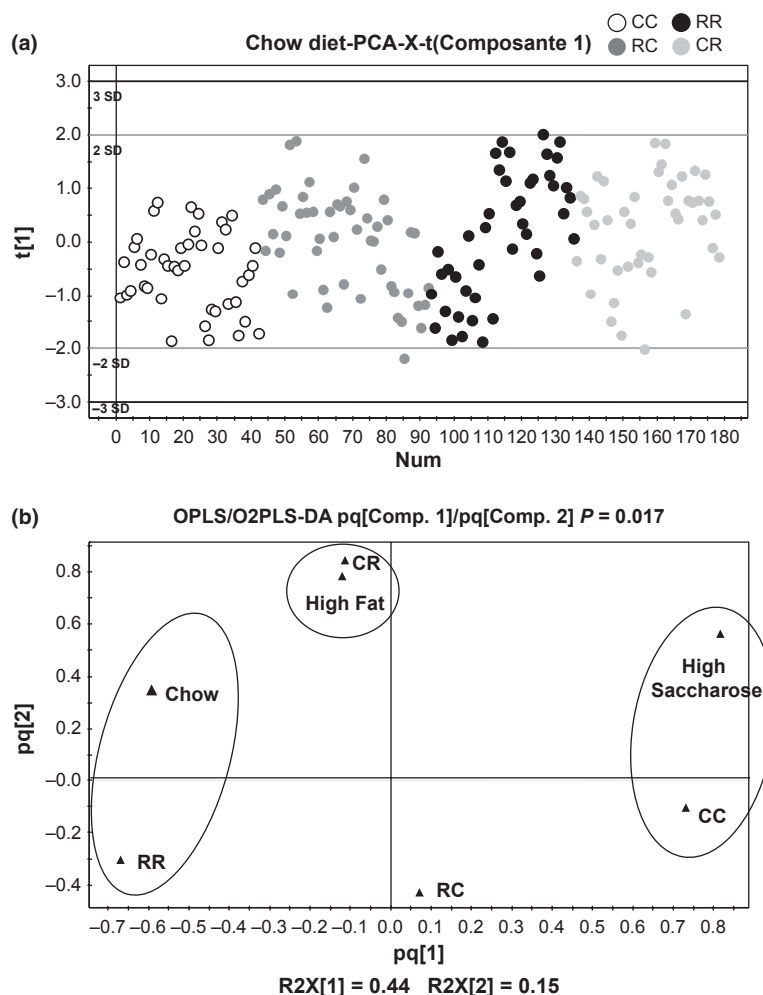


Figure 4 (a) Score plot of principal component analysis (PCA) for CC, RC, RR and CR rats for chow diet. (b) Orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) for the 4 perinatal nutritional groups associated with the three self-selected diets.

Table 2 Food consumption during the test of food preferences ($n = 5$)

	CC	RC	RR	CR
Energy intake (kcal) days ⁻¹ kg ⁻¹ BW	190.5 ± 9.1	183.4 ± 4.9 [#]	185.1 ± 2.3 ^{##}	203.7 ± 2.1
Energy intake (% of kcal) days ⁻¹ kg ⁻¹ BW				
Standard	46.6 ± 4.1	55.5 ± 3.6 ^{***}	58.6 ± 5.7 ^{***,##,\$}	50 ± 5.9 ^{\$}
High saccharose	34.6 ± 3.4	28.0 ± 3.3 ^{***}	20.8 ± 2.9 ^{***,\$\$\$}	27.7 ± 2.9 ^{***,\$\$\$}
High Fat	18.8 ± 3.3	16.5 ± 5.5	20.6 ± 4.1 ^{\$\$}	22.3 ± 3.9 [*]

^{*}, ^{***} vs. CC offspring, $P < 0.05$ or $P < 0.001$ respectively.

^{\$}, ^{\$\$}, ^{\$\$\$} vs. RC offspring, $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$ respectively.

[#], ^{##} vs. CR offspring, $P < 0.05$ or $P < 0.01$ respectively.

RCWD rats gained significantly more BW than their chow-fed group, and that was associated with significant higher relative adipose mass. CCWD showed a higher BW gain and adiposity than their chow-fed controls, but not significant. These anthropometric modifications were associated with an increased leptinaemia (not significant for RCWD). Interestingly, under Western diet, CRWD rats gained less BW and

less relative adipose tissue and did not show hyperleptinaemia.

Food intake pattern changes. To evaluate whether metabolic and physiological differences observed were due to distinct food consumption, we analysed the feeding pattern of the animals. Cumulative food intake (expressed as energy intake/g BW), delta food

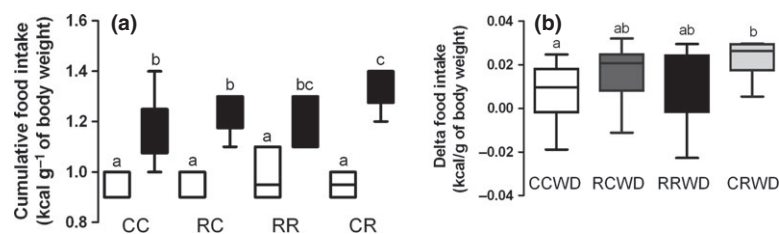
Table 3 Plasma leptin concentration, body weight gain and relative white adipose tissue mass gain from the four groups of male offspring into adulthood after chow or WD.

	Body weight gain (g)			Relative Adipose tissue (g kg ⁻¹ body weight)			Leptin (ng mL ⁻¹)		
	Chow	WD	Increase (%)	Chow	WD	Increase (%)	Chow	WD	Increase (%)
CC	68.1 ± 7.3	89.8 ± 13.3	+21	24.2 ± 1.0	27.2 ± 1.3	+12 ^α	14.5 ± 1.7	33.1 ± 8.0	+129 ^a
RC	47.6 ± 4.4 _t	97.1 ± 15.5	+79 ^b	19.5 ± 0.8 ^{**}	24.8 ± 1.9	+27 ^a	12.0 ± 2.8	15.5 ± 3.2	+29
RR	35.3 ± 4.5 ^{*,§,#}	79.7 ± 15.4	+102 ^a	18.9 ± 1.2 ^{**}	27.0 ± 1.2	+43 ^b	10.2 ± 2.7	19.1 ± 2.5	+87 ^a
CR	59.1 ± 7.2	71.9 ± 13.4	+17	20.1 ± 1.8 _t	21.9 ± 2.4 _T	+9	14.4 ± 2.7	14.9 ± 5.9	+4

^{*}, ^{**}, _t vs. CC offspring and, respectively, $P < 0.05$, $P < 0.01$ or trend.

[§] vs. RC offspring, $P < 0.05$ – _T vs. RR offspring, trend – # vs. CR offspring, $P < 0.05$.

% of increase labelled with a 'a' or a 'b' are significantly different at 5% or 1%, respectively, or a 'α' is a trend for one group of offspring between chow and Western diet.

**Figure 5** (a) Relative cumulative food intake of the four groups of rats from D164 to D220 after 8 weeks of chow diet or Western diet. (b) Delta of relative food intake of the four groups of rats after and before WD. Values are medians [minimum-maximum]. White boxes, chow-fed animals. Black boxes, WD-fed animals. $N = 7$ animals per group. Medians with different letters are significantly different at 5%.

intake for rats exposed to Western diet (calculated as the difference of energy intake/g BW after 8 weeks of WD exposure and before it) and parameters of the feeding patterns during 24 h of food presentation and their evolution between the light and dark phases are reported in Figure 5 and Table 4 respectively. Rats fed a standard chow diet displayed a similar cumulative food intake (Fig. 5a). However, when given unlimited access to a highly palatable diet (WD) from day 164 for up to 10 weeks, all animals increased significantly their food intake, CRWD rats even to a larger extent than CCWD (Fig. 5a,b), and increased their speed of ingestion (Table 4).

During the 24-h feeding pattern analysis of both diets, all groups displayed a clear increase, between day and night period, in their meal number, relative meal size and food intake. On chow diet, RC and RR rats presented a higher speed of ingestion as compared to CC and CR rats (Table 4). On Western diet, relative meal size and meal number of RCWD and RRWD were higher than of CCWD in day period resulting in higher relative food intake, whereas only relative meal size was increased for CRWD compared with CCWD. During the dark phase, RRWD and CRWD had significant higher meal number and relative meal size leading to significant larger quantity of

calorie intake than CCWD rats. This observation tended to be the same for RCWD, but did not reach significance because animal number was small in this group.

Changes in hypothalamic neuropeptide genes expression in response to a highly palatable diet. To correlate hyperphagia observed under WD to change in markers of appetite regulation, we measured, in the hypothalamus, the gene expression of orexigenic and anorexigenic neuropeptides with associated signalling molecules and regulating factors of fat intake. In response to a highly palatable diet, CCWD animals had a significant decrease in expression of the orexigenic neuropeptides NPY and AgRP (Fig. 6a) and a slight but not significant decrease in NPY receptors Y1r and Y5r (Fig. 6a). In RRWD rats, Y1r expression was significantly increased. No change was observed in genes expression of CRWD rats. In addition, no significant difference for the hypothalamic expression of the anorexigenic neuropeptides POMC and CART was measured in any groups after WD (data not shown). However, leptin signalling was markedly altered by WD diet intake in both IUGR groups where a significant increase in ObRa was observed (Fig. 7b–d) along with a large

Table 4 Food patterns parameters from the four groups of 209-day-old rats CC fed a chow or Western diet.

Meal Number		Meal size (kcal kg ⁻¹ BW)		Food intake (kcal kg ⁻¹ BW)		Ingestion rate (mg s ⁻¹)	<i>n</i> per group	
Chow	WD	Chow	WD	Chow	WD			
Day		Day		Day		Chow	Chow	
CC	11.1 ± 1.9 ^a	5.6 ± 0.8 ^b	9.8 ± 2.3 ^a	22.0 ± 1.7 ^b	28.8 ± 4.4	36.5 ± 4.0	2.5 ± 0.3	4
RC	9.0 ± 0.8	11.8 ± 1.5 [*]	14.1 ± 3.9 ^a	51.2 ± 11.5 ^{b*}	39.8 ± 7.8	78.7 ± 11.1 [*]	3.5 ± 0.2 ^{*#}	4
RR	8.2 ± 1.1	9.3 ± 0.9 [*]	10.7 ± 0.8 ^c	39.8 ± 8.9 ^{d*}	30.2 ± 4.2 ^a	69.7 ± 6.3 ^{b**}	3.6 ± 0.2 ^{*#}	5
CR	10.5 ± 1.0	7.9 ± 2.2	12.2 ± 1.0 ^a	37.2 ± 5.9 ^{b**}	37.4 ± 8.1	51.1 ± 9.1	2.4 ± 0.3	5
Night		Night		Night		WD	WD	
CC	21.1 ± 5.4	12.4 ± 1.2	26.8 ± 6.0 ^c	52.8 ± 3.1 ^d	71.3 ± 10.8	88.8 ± 5.5	5.6 ± 0.6	5
RC	28.3 ± 1.4 ^a	18.2 ± 3.1 ^b	31.6 ± 3.7 ^a	61.4 ± 7.7 ^b	90.1 ± 3.4	124 ± 17.4	5.2 ± 0.3	4
RR	21.6 ± 5.7	16.9 ± 1.0 [*]	27.0 ± 4.6 ^c	69.4 ± 3.9 ^{d,**}	74.6 ± 14.4	122 ± 4.3 ^{**}	5.9 ± 0.6	6
CR	17.3 ± 2.9 ^{\$}	19.7 ± 2.1 [*]	20.7 ± 5.8 ^c	76.5 ± 5.7 ^{d,**}	65.0 ± 11.4	134 ± 10.2 ^{**}	5.3 ± 0.4	5

* ** vs. CC offspring and respectively, $P < 0.05$ or $P < 0.01$.

\$ vs. RC offspring, $P < 0.05$.

vs. CR offspring, $P < 0.05$.

Means labelled with different letters are significantly different, a vs. b at 5% or c vs. d at 1% for one group of offspring between chow and Western diets.

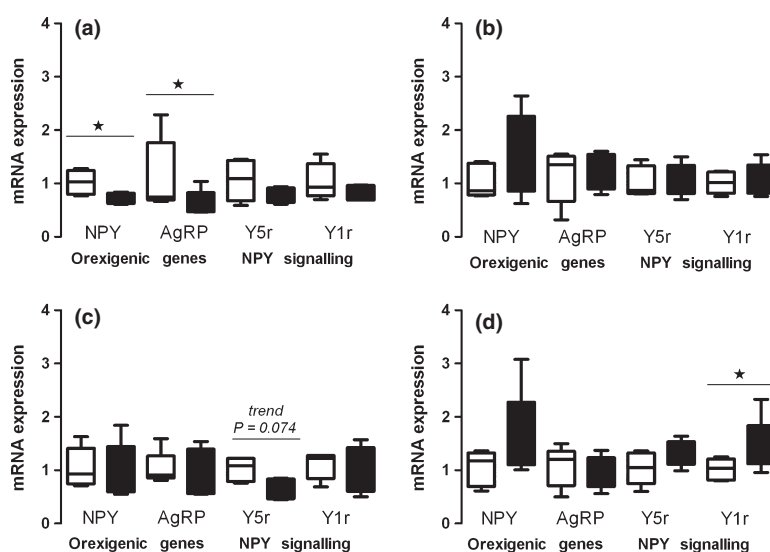


Figure 6 Hypothalamic expression levels of NPY, AgRP, NPY receptors Y5r and Y1r mRNAs from CC (a), RC (b), CR (c) and RR (d) male offspring of 234 days under fasting conditions. Data are medians [minimum-maximum] ($n = 5$). White boxes, chow-fed animals. Black boxes, WD-fed animals. ★ chow vs. Western diet, $P < 0.05$.

increase in SOCS3 expression in RRWD rats. Hypothalamic enterostatin expression was significantly lower in CRWD rats compared with their chow-fed group (Fig. 8), but no change was observed for the other groups (data not shown). Hypothalamic 5-HT1b and MC4r mRNA expressions, receptors involved in enterostatin central inhibitory effects on fat intake, were also lower in CRWD rats (Fig. 8).

Discussion

The present study is designed to illustrate the relative contribution of foetal and post-natal nutritional periods

on food intake regulation in the rat male at adulthood. Despite a large body of evidence showing that IUGR followed by rapid post-natal growth increases adiposity, very little is known about the underlying mechanism. We focused our work on the analysis of feeding rhythms, speed of ingestion and nutrients preference as possible early cues leading to metabolic syndrome. In this work, we show that (i) rats born with an IUGR, independently of the post-natal speed of growth, are more sensitive to a chronic high-energy diet in adulthood because they gain more weight and develop more relative fat mass than CC animals, and (ii) restriction of protein intake during lactation only, provides to the offspring long-term obesity protection under chow and

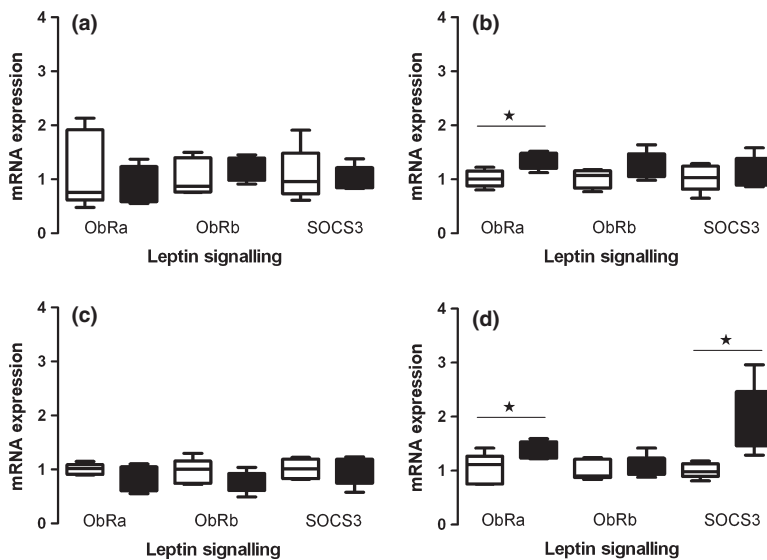


Figure 7 Hypothalamic expression levels of ObRa, ObRb and SOCS3 mRNAs from CC (a), RC (b), CR (c) and RR (d) male offspring of 234 days under fasting conditions. Data are medians [minimum-maximum] ($n = 5$). White boxes, chow-fed animals. Black boxes, WD-fed animals. ★ chow vs. Western diet, $P < 0.05$.

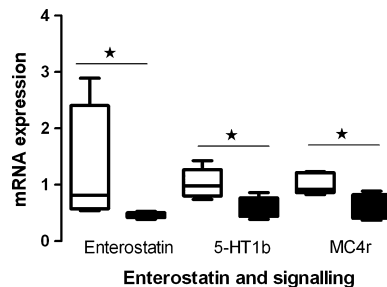


Figure 8 Hypothalamic expression levels of procolipase (enterostatin precursor), 5-HT1b and MC4r mRNA from CR male offspring of 234 days under fasting conditions. Data are medians [minimum-maximum] ($n = 5$). White boxes, chow-fed animals. Black boxes, WD-fed animals. ★ chow vs. Western diet, $P < 0.05$.

high-energy diets at adulthood. In regard to these findings, we observe (iii) daytime hyperphagia for IUGRWD rats compared with CCWD and (iv) higher food consumption following chronic WD exposure for CRWD rats than for CCWD and RCWD. Finally, considering genes expression of key hypothalamic regulators of feeding regulation, we present evidence that high-energy diet (v) decreases mRNA levels of orexigenic neuropeptides in the hypothalamus of CCWD rats, but not of IUGRWD rats, (vi) alters mRNA levels of leptin pathways for IUGRWD rats and (vii) leads to down-expression of enterostatin and its signalling in CRWD rats.

These findings appear in line with the concept of the thrifty phenotype observed in IUGR individuals who become at high risk to develop metabolic disorders and obesity when exposed to a suboptimal nutritional environment (Fernandez-Twinn & Ozanne 2010, Sarr *et al.* 2012). This is widely described in clinical studies

(Hanley *et al.* 2010, Sullivan & Grove 2010) and in numerous experimental models of maternal protein or caloric restriction (Bieswal *et al.* 2006, Cottrell & Ozanne 2008, Palou *et al.* 2010, Remacle *et al.* 2011). Additionally, others also observed the long-term protection effect of restricted energy intake during lactation (Ozanne *et al.* 2004, Zambrano *et al.* 2006, Palou *et al.* 2011).

Feeding rhythm modifications as early predictors of obesity onset in IUGR offspring

In the present study, ingestion of Western diet did not affect animals' feeding pattern in a similar way regarding their peri-natal nutritional experience. The four groups of rats WD evoke a hyperphagia due to the presentation of a palatable diet as previously described (Archer *et al.* 2004). The novel finding of this study is the change in the 24-h organization of feeding ingestion in the two IUGRWD groups in which we clearly show that meal number, relative meal size and food intake were increased during the light period. On a 24-h period, RCWD and RRWD rats ate 40% of the total intake during the daytime and 60% at night when daily food intake repartition was about 30–70% independently of the type of diet for the CC and CR animals. It is well established that meal size and meal number are influenced by circadian rhythm, and it has been shown that obesity is associated with an increase in daytime food intake (Fetissov *et al.* 2000). Such data are in favour of a strong link between alteration in food pattern and fat mass deposit in our pre-obese IUGR animals. In accordance with our data, Sutton and colleagues (Sutton *et al.* 2010) described a higher daytime food intake in pre-obese mice born with an IUGR fol-

lowed by a post-natal catch-up growth. Furthermore, they showed that during the first 4 h of daytime, the hyperphagia was associated with higher energy expenditure and RER (respiratory exchange ratio). The RER remained >1.0 in comparison with control ($\text{RER} < 1.0$), which suggests lipogenesis. The hypothesis of an altered circadian physiology as a key step in obesity development is now supported by many studies (Mendoza *et al.* 2008, Sutton *et al.* 2010, Orozco-Solis *et al.* 2011).

Leptin resistance in IUGR offspring as an early mechanism in obesity onset

Chronic high-energy diet intake induced a significant weight gain in the two IUGRWD groups, whereas the weight gain was lower and not significant in the CCWD group. In the later, the adiposity-related signal as leptin induction was accompanied by changes in neuropeptides expression reflecting the state of positive energy balance and an attempt to counteract it. Consecutive to the increased leptin concentration, CCWD group presented a significant decrease in the expression of orexigenic NPY and AgRP that probably represents a compensatory response to high-energy diet by reducing food intake (Wang *et al.* 1997, Lin *et al.* 2000a, Niimi *et al.* 2001, Archer *et al.* 2004). On the contrary, RCWD and RRWD hyperphagia was associated with an up-regulation of NPY mRNA expression (ns) and an increased Y1r hypothalamic expression in the RRWD animals despite higher leptinaemia. Therefore, in these animals, there is no compensatory mechanism to decrease the intake of the highly palatable WD. As NPY increases energy intake, decreases energy expenditure and increases lipogenesis (Grove & Smith 2003), this would be consistent with a long-term fat depot in RCWD and RRWD in case of a loss of leptin sensitivity.

To gain further insight in leptin sensitivity of these animals, we looked for the expression of markers of the leptin signalling cascade on a fasting state in response to standard chow diet or WD. Leptin resistance has been previously associated with (i) an altered blood brain barrier transport *via* its short isoform transporter, ObRa (Caro *et al.* 1996, Schwartz *et al.* 1996); (ii) a disturbed signal transduction due to down-regulation of hypothalamic leptin receptor, ObRb (Baskin *et al.* 1998); and (iii) an overexpression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), shown to mediate negative feedback inhibition for leptin (Bjorbaek *et al.* 1998) and linked to obesity (Howard *et al.* 2004). In the present study, 10 weeks of WD is associated with an up-regulation of the hypothalamic expression ObRa in RCWD and RRWD rats. This is not contradictory with some leptin resistance in these two groups as Lin and co-workers showed such a

result in diet-induced obese mouse exposed to a high-fat diet containing 58.7% (by energy) of fat (Lin *et al.* 2000b). An up-regulation of ObRa mRNA expression in the arcuate nucleus was associated with peripheral leptin resistance after 8 weeks of high-energy diet, whereas after 19 weeks of diet, its down-regulation was linked to central leptin resistance (Lin *et al.* 2000a). In our study, ObRb mRNA expression was maintained constant. However, we could not exclude that those differences might be hidden in our experiment by looking at the whole hypothalamus because ObRb expression varies according to hypothalamic nuclei (Coupe *et al.* 2010). Finally, our findings showed that 10 weeks of WD induces a marked increase of hypothalamic SOCS3 expression in RRWD rats. Indeed, in one of our previous study, we also demonstrated early signs of leptin resistance in 5-month-old IUGR rats whose mechanism was different between RC and RR rats (Coupe *et al.* 2012). Leptin resistance is often characterized by high fasting plasma leptin concentration (Bjorbaek *et al.* 1998). In our study, all rats under WD did show high fasting circulating levels of leptin matching with the accumulation of fat pads at the exception of CRWD animals.

An interesting phenotype is observed in CRWD rats where high-energy intake is correlated with a reduced BW gain, low fat pad development, stable plasmatic leptin concentration and a constant NPY transcription. Taken together, these results suggest higher leptin sensitivity in CRWD rats. This observation is in agreement with the leptin hypersensitivity described very recently on Wistar rats of 3 months old having a low post-natal growth due to protein restriction of the lactating mothers (Stocker *et al.* 2012).

Early mechanisms responsible for this programming remain to be clarified. Post-natal leptin surge between D4 and D16 has been proposed to be one potential factor responsible for later leptin resistance onset (Yura *et al.* 2005). In the present study, post-natal period was characterized by a constant plasma leptin level for RC rats as compared to CC and to RR whose leptin surge was reduced. However, both IUGR groups gained more weight and adiposity than control rats under WD. In addition, Cottrell *et al.* (2011) have shown that IUGR offspring from Ob/Ob mothers develop a stronger hyperphagia and obesity than 'normal weight' Ob/Ob offspring, conferring credit to the hypothesis that post-natal leptin surge is not the crucial signal. Taking all these arguments together, it is possible that the gestational period remains the critical time window responsible for leptin resistance programming in IUGR rodents (Coupe *et al.* 2012). At the opposite, higher leptin sensitivity has been described in offspring rats suckled by mothers restricted in protein during lactating period (Stocker

et al. 2012), consistent with data obtained for CR rats of the present study. The differences in pups plasma leptin could not be explained solely by milk leptin content (Bautista *et al.* 2008); therefore, other sources of leptin might contribute more to pups leptin level.

Weak fat satiety as a result of post-natal protein restriction without IUGR

The dramatic hyperphagia observed in CR rats was not previously described. Their appetite could be reflective either of higher energy expenditure including a higher basal metabolic rate or of altered feeding modulation systems. CR rats might be more sensitive to sight, smell, texture, previous ingestion experience and taste of food, all factors driving food behaviour (Nestle *et al.* 1998, Erlanson-Albertsson 2005). Indeed, CR rats were characterized by a strong preference for high-fat food as demonstrated during the test of food preferences and also in the chronic high-energy diet experiment. Considering hypothalamic neuropeptide expression, these results are consistent with the lower mRNA expression of enterostatin, 5-HT1b and MC4r in response to 10 weeks of WD because these factors have been strongly associated with fat intake reduction after chronic ingestion of high-fat diet (Simansky 1996, Erlanson-Albertsson & York 1997, Smith *et al.* 1999, Meguid *et al.* 2000, Berger *et al.* 2004). Furthermore, it has been demonstrated that central feeding inhibitory effects of enterostatin are modulated by 5-HT1b receptor (Lin & York 2005) and through the melanocortin system (Lin *et al.* 2007). Thus, CR rats may have a weak satiety for fat as a result of the lactation period insult.

In conclusion, we clearly brought numerous evidences of peri-natal nutrition programs feeding pattern and food choices. These effects are sustained by modifications after chronic Western diet in hypothalamic genes expression involved in satiety and specific macronutrient intake. Thus, gestation and lactation periods represent key windows of investigation for a better understanding of the feeding behaviour physiology and metabolic adaptation. Moreover, the particular phenotype observed in CRWD compared with both IUGRWD rats can be attributed to a low post-natal growth rate during lactation period, which is a key period for metabolic programming and represent an easy target for medical prevention and treatment.

Conflict of interest

The authors have nothing to declare.

A. Martin Agnoux was the recipient of a doctoral fellowship from PONAN (Pôle Nantais Alimentation et Nutrition).

References

- Archer, Z.A., Rayner, D.V. & Mercer, J.G. 2004. Hypothalamic gene expression is altered in underweight but obese juvenile male Sprague-Dawley rats fed a high-energy diet. *J Nutr* **134**, 1369–1374.
- Barker, D.J. 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* **301**, 1111.
- Barker, D.J. 1995a. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest* **25**, 457–463.
- Barker, D.J. 1995b. The Wellcome Foundation Lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. *Proc Biol Sci* **262**, 37–43.
- Baskin, D.G., Seeley, R.J., Kuijper, J.L., Lok, S., Weigle, D.S., Erickson, J.C., Palmiter, R.D. & Schwartz, M.W. 1998. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes* **47**, 538–543.
- Bautista, C.J., Boeck, L., Larrea, F., Nathanielsz, P.W. & Zambrano, E. 2008. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res* **63**, 358–363.
- Berger, K., Winzell, M.S., Mei, J. & Erlanson-Albertsson, C. 2004. Enterostatin and its target mechanisms during regulation of fat intake. *Physiol Behav* **83**, 623–630.
- Bieswal, F., Ahn, M.T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W.D. & Remacle, C. 2006. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* **14**, 1330–1343.
- Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E. & Flier, J.S. 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* **1**, 619–625.
- Bouret, S.G., Draper, S.J. & Simerly, R.B. 2004a. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci* **24**, 2797–2805.
- Bouret, S.G., Draper, S.J. & Simerly, R.B. 2004b. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* **304**, 108–110.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannessian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K. & Considine, R.V. 1996. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* **348**, 159–161.
- Castonguay, T.W., Kaiser, L.L. & Stern, J.S. 1986. Meal pattern analysis: artifacts, assumptions and implications. *Brain Res Bull* **17**, 439–443.
- Cota, D., Proulx, K. & Seeley, R.J. 2007. The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* **132**, 2158–2168.
- Cottrell, E.C. & Ozanne, S.E. 2008. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav* **94**, 17–28.
- Cottrell, E.C., Martin-Gronert, M.S., Fernandez-Twinn, D.S., Luan, J., Berends, L.M. & Ozanne, S.E. 2011. Leptin-independent programming of adult body weight and adiposity in mice. *Endocrinology* **152**, 476–482.

- Coupe, B., Grit, I., Darmaun, D. & 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**, R813–R824.
- Coupe, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A. & Parnet, P. 2010. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* **151**, 702–713.
- Coupe, B., Delamaire, E., Hoebler, C., Grit, I., Even, P., Fromentin, G., Darmaun, D. & Parnet, P. 2011. Hypothalamus integrity and appetite regulation in low birth weight rats reared artificially on a high-protein milk formula. *J Nutr Biochem* **22**, 956–963.
- Coupe, B., Grit, I., Hulin, P., Randuineau, G. & Parnet, P. 2012. Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. *PLoS ONE* **7**, e30616.
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J. & Ross, M.G. 2007. The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am J Obstet Gynecol* **196**(555), e1–e7.
- Devaux, M. & De Looper, M. 2012. *Income-related Inequalities in Health Service Utilisation in 19 OECD Countries, 2008–2009*. OECD Health Working Papers, No. 58, OECD Publishing. <http://dx.doi.org/10.1787/5k95xd6stnxt-en>.
- Erlanson-Albertsson, C. 2005. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **97**, 61–73.
- Erlanson-Albertsson, C. & York, D. 1997. Enterostatin—a peptide regulating fat intake. *Obes Res* **5**, 360–372.
- Erlanson-Albertsson, C., Mei, J., Okada, S., York, D. & Bray, G.A. 1991. Pancreatic procolipase propeptide, enterostatin, specifically inhibits fat intake. *Physiol Behav* **49**, 1191–1194.
- Fanca-Berthon, P., Michel, C., Pagniez, A., Rival, M., Van Seuningen, I., Darmaun, D. & Hoebler, C. 2009. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatr Res* **66**, 47–52.
- Fernandez-Twinn, D.S. & Ozanne, S.E. 2010. Early life nutrition and metabolic programming. *Ann N Y Acad Sci* **1212**, 78–96.
- Fetissov, S.O., Meguid, M.M., Shafiroff, M., Miyata, G. & Torelli, G.F. 2000. Dopamine in the VMN of the hypothalamus is important for diurnal distribution of eating in obese male Zucker rats. *Nutrition* **16**, 65–66.
- Grayson, B.E., Kievit, P., Smith, M.S. & Grove, K.L. 2010. Critical determinants of hypothalamic appetitive neuropeptide development and expression: species considerations. *Front Neuroendocrinol* **31**, 16–31.
- Grigor, M.R., Allan, J., Carne, A., Carrington, J.M. & Geurzen, A. 1986. Milk composition of rats feeding restricted litters. *Biochem J* **233**, 917–919.
- Grove, K.L. & Smith, M.S. 2003. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav* **79**, 47–63.
- Hanley, B., Dijane, J., Fewtrell, M., Grynberg, A., Hummel, S., Junien, C., Koletzko, B., Lewis, S., Renz, H., Symonds, M., Gros, M., Harthoorn, L., Mace, K., Samuels, F. & van Der Beek, E.M. 2010. Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities. *Br J Nutr* **104**(Suppl 1), S1–S25.
- Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzamelis, I., Bjorbaek, C. & Flier, J.S. 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* **10**, 734–738.
- Jones, A.P., Simson, E.L. & Friedman, M.I. 1984. Gestational undernutrition and the development of obesity in rats. *J Nutr* **114**, 1484–1492.
- Jones, A.P., Assimon, S.A. & Friedman, M.I. 1986. The effect of diet on food intake and adiposity in rats made obese by gestational undernutrition. *Physiol Behav* **37**, 381–386.
- Keith, S.W., Redden, D.T., Katzmarzyk, P.T., Boggiano, M.M., Hanlon, E.C., Benca, R.M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J.L., Fontaine, K.R. et al. 2006. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)* **30**, 1585–1594.
- Langley-Evans, S.C., Bellinger, L. & McMullen, S. 2005. Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour. *Matern Child Nutr* **1**, 142–148.
- Lin, L. & York, D.A. 2005. 5-HT_{1B} receptors modulate the feeding inhibitory effects of enterostatin. *Brain Res* **1062**, 26–31.
- Lin, S., Storlien, L.H. & Huang, X.F. 2000a. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* **875**, 89–95.
- Lin, S., Thomas, T.C., Storlien, L.H. & Huang, X.F. 2000b. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**, 639–646.
- Lin, L., Park, M. & York, D.A. 2007. Enterostatin inhibition of dietary fat intake is modulated through the melanocortin system. *Peptides* **28**, 643–649.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-(Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Meguid, M.M., Fetissov, S.O., Varma, M., Sato, T., Zhang, L., Laviano, A. & Rossi-Fanelli, F. 2000. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* **16**, 843–857.
- Mendoza, J., Pevet, P. & Challet, E. 2008. High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol* **586**, 5901–5910.
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S. & Schwartz, M.W. 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**, 289–295.
- Nestle, M., Wing, R., Birch, L., DiSogra, L., Drewnowski, A., Middleton, S., Sigman-Grant, M., Sobal, J., Winston, M. & Economos, C. 1998. Behavioral and social influences on food choice. *Nutr Rev* **56**, S50–S64; discussion S64–S74.
- Niimi, M., Sato, M. & Taminato, T. 2001. Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin. *Endocrine* **14**, 269–273.
- Orozco-Solis, R., Matos, R.J., Lopes de Souza, S., Grit, I., Kaeffer, B., Manhaes de Castro, R. & 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**, 990–1000.

- Ozanne, S.E. & Nicholas Hales, C. 2005. Poor fetal growth followed by rapid postnatal catch-up growth leads to premature death. *Mech Ageing Dev* **126**, 852–854.
- Ozanne, S.E., Lewis, R., Jennings, B.J. & Hales, C.N. 2004. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin Sci (Lond)* **106**, 141–145.
- Palou, M., Priego, T., Sanchez, J., Torrens, J.M., Palou, A. & Pico, C. 2010. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* **151**, 1030–1041.
- Palou, M., Torrens, J.M., Priego, T., Sanchez, J., Palou, A. & 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**, 574–584.
- Paxinos, G. & Watson, C. 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th edn. Elsevier Academic Press, New York, USA.
- Plagemann, A., Harder, T., Schellong, K., Schulz, S. & Stupin, J.H. 2012. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**, 641–653.
- Ravelli, G.P., Stein, Z.A. & Susser, M.W. 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* **295**, 349–353.
- Remacle, C., Bieswal, F., Bol, V. & Reusens, B. 2011. Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *Am J Clin Nutr* **94**, 1846S–1852S.
- van der Sande, M.A., Ceesay, S.M., Milligan, P.J., Nyan, O.A., Banya, W.A., Prentice, A., McAdam, K.P. & Walraven, G.E. 2001. Obesity and undernutrition and cardiovascular risk factors in rural and urban Gambian communities. *Am J Public Health* **91**, 1641–1644.
- Sarr, O., Yang, K. & Regnault, T.R. 2012. In utero programming of later adiposity: the role of fetal growth restriction. *J Pregnancy* **2012**, 134758.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P. & Baskin, D.G. 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* **98**, 1101–1106.
- Simansky, K.J. 1996. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res* **73**, 37–42.
- Smith, B.K., York, D.A. & Bray, G.A. 1999. Activation of hypothalamic serotonin receptors reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *Am J Physiol* **277**, R802–R811.
- Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B. & Hoet, J.J. 1990. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* **57**, 107–118.
- Sorhede, M., Mulder, H., Mei, J., Sundler, F. & Erlanson-Albertsson, C. 1996. Procolipase is produced in the rat stomach—a novel source of enterostatin. *Biochim Biophys Acta* **1301**, 207–212.
- Stocker, C.J., Wargent, E.T., Martin-Gronert, M.S., Cripps, R.L., O'Dowd, J.F., Zaibi, M.S., Cottrell, E.C., Mercer, J.G., Duncan, J.S., Cawthorne, M.A., Ozanne, S.E. & Arch, J.R. 2012. Leanness in postnatally nutritionally programmed rats is associated with increased sensitivity to leptin and a melanocortin receptor agonist and decreased sensitivity to neuropeptide Y. *Int J Obes (Lond)* **36**, 1040–1046.
- Sullivan, E.L. & Grove, K.L. 2010. Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr* **63**, 186–194.
- Sutton, G.M., Centanni, A.V. & Butler, A.A. 2010. Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. *Endocrinology* **151**, 1570–1580.
- Trygg, J., Holmes, E. & Lundstedt, T. 2007. Chemometrics in metabolomics. *J Proteome Res* **6**, 469–479.
- Vickers, M.H. & Sloboda, D.M. 2012. Leptin as mediator of the effects of developmental programming. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**, 677–687.
- Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D.E., Wang, X.M., McBay, D.L., Neville, W.A., Taddayon, M., Pickavance, L., Dryden, S. et al. 1997. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* **46**, 335–341.
- York, D.A., Lin, L., Thomas, S.R., Braymer, H.D. & Park, M. 2006. Procolipase gene expression in the rat brain: source of endogenous enterostatin production in the brain. *Brain Res* **1087**, 52–59.
- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura, M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y. & Fujii, S. 2005. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* **1**, 371–378.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P.M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F. & 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**, 221–230.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Food intake (g) of C dams (white circle) and R dams (Black circle) during gestation and lactation.

Figure S2. Score plot of Principal component analysis (PCA) for CC, RC, RR and CR rats for high-saccharose (HS) (S2A) and for high fat (HF) (S2B) diets.

Table S1. Composition of experimental diets (g kg⁻¹ diet).

Table S2. Energy and nutrient composition of experimental diets in the self-food selection.

Table S3. Primer sequences used for analyses of mRNA expression.

SUPPLEMENTARY DATA

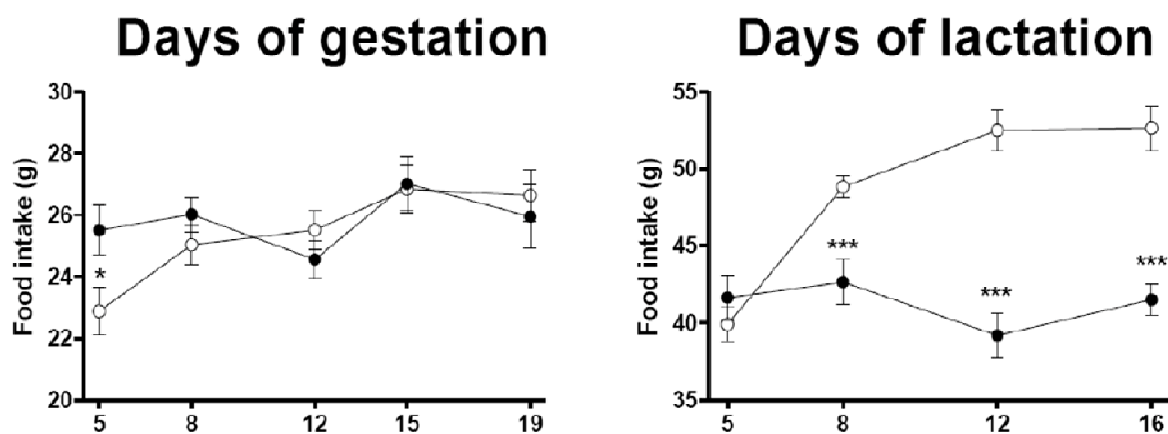


Figure S1. Food intake (g) of C dams (white circle) and R dams (Black circle) during gestation and lactation. Values are mean $\pm$ SEM. The symbols *, **, *** indicate significant difference between R and C dams with $p < 0.0$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively.

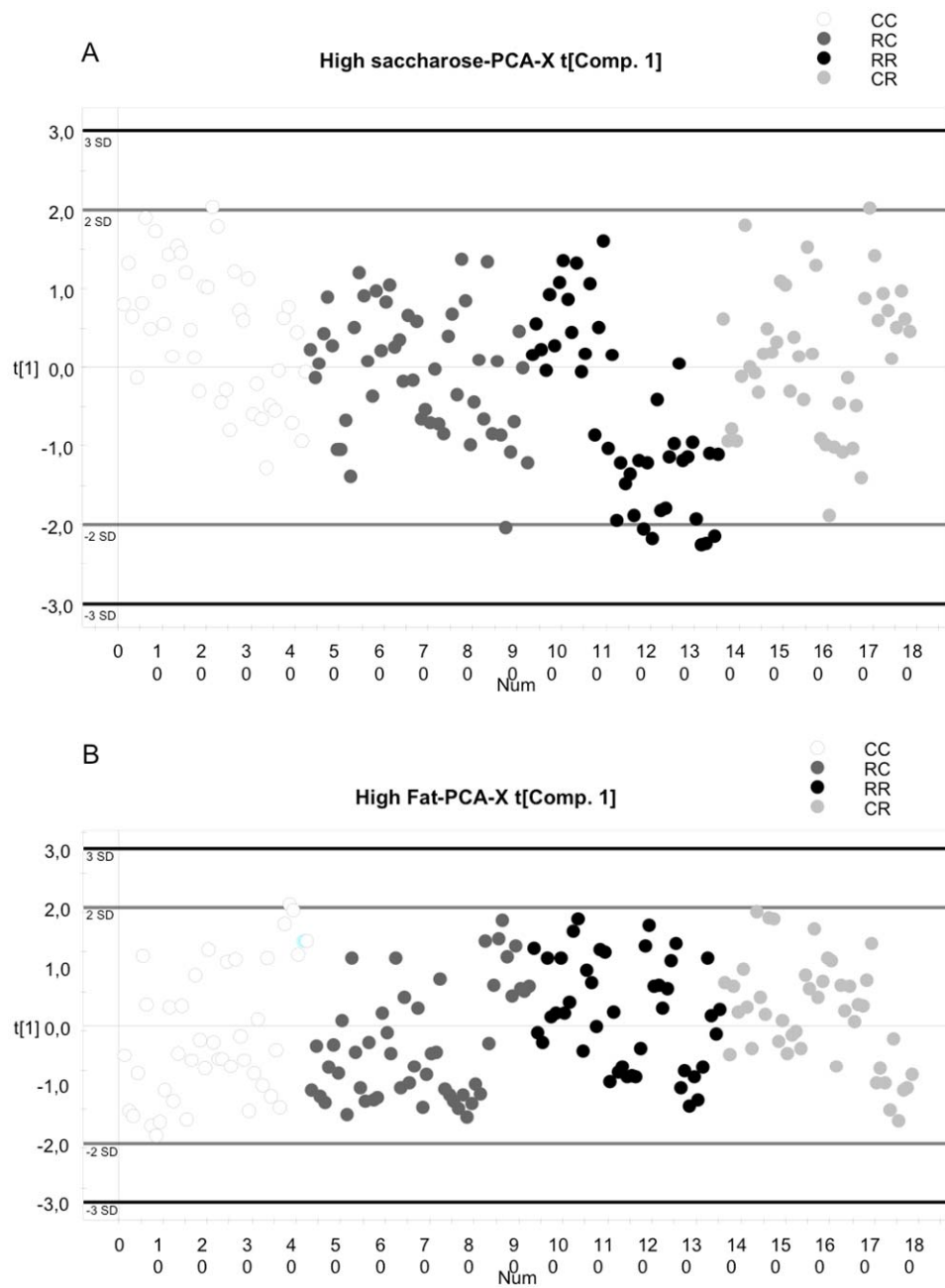


Figure S2. Score plot of Principal component analysis (PCA) for CC, RC, RR and CR rats for high-saccharose (HS) (S2A) and for high fat (HF) (S2B) diets.

Table S1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Macronutrient	Control (20 % protein)	Low protein (8 % protein)	Standard Chow	Western Diet
Protein				
Casein	220	90	180	195
Carbohydrate				
Cornstarch	80	80	630	50
Maltodextrin 10	552	682		100
Sucrose				341
Fat				
Vegetable oil	43	43	37	10
Milk fat				200
Cellulose	50	50	53	50
Vitamin Mix	10	10	10	10
Mineral Mix	47	48	40	35
Energy density (kcal/g)	3.7	3.7	3.6	4.7
% macronutrient kcal/g				
Protein	20	8.0	16	17
Carbohydrate	63	76	64	43
Fat	4.3	4.3	3	41

Diet suppliers: Control and low protein diets, AB Diets (Woerden, the Netherlands); standard chow, SAFE, Augy, France.

Table S2. Energy and nutrient composition of experimental diets in the self-food selection

Diets	Chow	High Saccharose	High fat
Proteins (casein)	16.0	16.0	16.0
Carbohydrate			
Cornstarch	30.0	-	8.0
Glucose	38.5	-	38.5
Saccharose	-	68.5	-
Fat			
Lard	3.0	3.0	25.0
Corn oil	1.0	1.0	1.0
Soy oil	1.0	1.0	1.0
Fiber (cellulose)	6.0	6.0	6.0
Vitamin and mineral mix	4.5	4.5	4.5
Energy (kcal/100g)	387.0	387.0	497.0

Values are in grams per 100 g of diet.

Table S3. Primer sequences used for analyses of mRNA expression

Gene	5'- Sense primer -3'	5'- Antisense primer -3'
NPY	GTGGACTGACCCTCGTCTATC	ATGAGATTGATGTAGTGTCGCAGAG
Npy1r	AATTCCCGTCAGACTCTCAC	GCGAACGTATATCTTGAAGTAGC
Npy5r	ACTTAACCCTACAGCCATCC	TTCTTGCTGTACCTCCTTCTG
AgRP	CAG AGG TGC TAG ATC CAC AG	AGG TAT TGA AGA AGC GGC AG
MC4r	GTGAATACTACGGCTAAAGGG	AGTTGTTGGTCTCTTCTGGG
ObRa	CTCTCCAGAGAATGAAAAAGTTGTTT	CTCTTTGAAGTATCTCATGACCACTACA
ObRb	CTCTCCAGAGAATGAAAAAGTTGTTT	TTTGAGCATCTTTTTACCAAGCAT
SOCS3	CCTCCAGCATCTTTGTCTCGGAAGAC	TACTGGTCCAGGAAGTCCCGAATG
POMC	GAGGTTAAGGAGCAGTACTAAGAG	GTAGCAGAATCTCGGCATCTTCC
CART	GCT CAA GAG TAA ACG CAT TCC	AAG AAT TGC AAG AAG TTC CTC G
5HT1b	GATGAGGAGCAGGGTGGGTAAATAG	CAAGCCAAAGCGGAGGAGGAG
Clps	TGTTCTGCTTGTAACCCTCGTTGC	ATTGCCAATGGGTGACTCAGATGG
β -actin	TCC TGG GTA TGG AAT CCT GTG G	TCT CCT TCT GCA TCC TGT CAG C

Article 2:

Time-window dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in male offspring exposed to Western diet in adulthood

A. Martin Agnoux, J.-P. Antignac, G. Simard, G. Poupeau, D. Darmaun, P. Parnet, M.-C.

Alexandre-Gouabau

Soumis à Diabetes

Le diabète mellitus est la maladie endocrine la plus fréquente chez l'Homme (Wild et al, 2004). Elle touchait plus de 170 millions de personnes à travers le monde dans les années 2000 et, selon les estimations et projections effectuées, devrait toucher plus de 365 millions de personnes en 2030. En parallèle de cette épidémie grandissante, une augmentation des complications associées au diabète est également attendue, comme la prévalence des cardiopathies ischémiques, infarctus, neuropathies, rétinopathies et néphropathies. Le DT2M est donc rapidement apparu comme l'un des défis de santé les plus importants pour le 21^{ème} siècle.

Il est dorénavant clairement établi que les individus nés avec un petit poids induit par un retard de croissance intra-utérin présentent un risque plus important de développer un diabète de type 2 (Hales et al, 1991). Il existe une importante quantité de données expérimentales morphologiques, métaboliques et épigénétiques en faveur de l'existence d'une programmation, par l'environnement périnatal, de l'insulino-résistance (Ozanne et al, 2001, 2003, 2005; Berends et al, 2012; Bol et al, 2008) ainsi que de l'altération de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas (Reusens et al, 2011; Simmons, 2007; Theys et al, 2011). Les résultats sur la descendance mâle née de mères restreintes en protéines pendant la gestation montrent que la production hépatique de glucose serait favorisée plutôt que sa consommation (Desai et al, 1995; Burns et al 1997; Vo et al, 2013), facteur prédisposant à l'insulino-résistance. Malgré l'accumulation de ces observations, la nature exacte de cette programmation métabolique reste encore imparfaitement caractérisée. De plus, des études réalisées chez le rat dont la mère a été exposée à un régime hypoprotidique en période périnatale, montrent une augmentation de l'insulino-sensibilité des tissus périphériques chez le jeune adulte avant son déclin progressif, conduisant à terme à une insulino-résistance de façon âge-dépendant (Langley et al, 1994; Ozanne et al, 1996; Shepherd et al, 1997; Petry et

al, 2000). La séquence précise de la physiopathologie qui mène à l'insulino-résistance reste toujours largement inconnue bien que de récentes études aient contribué à comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'altération de l'action de l'insuline.

Dans cette étude, nous avons souhaité évaluer, en fonction des trajectoires de croissance pré- et postnatale modulées par le régime maternel, les effets à long terme de la programmation métabolique sur 1) l'insulino-sensibilité périphérique, 2) le métabolisme énergétique et 3) les capacités sécrétoires des cellules β du pancréas en amont du développement d'un franc diabète de type 2. Nous nous sommes ainsi intéressés à des animaux pré-diabétiques dans l'objectif de déceler les altérations précoces du métabolisme.

La compréhension de l'ensemble des réseaux métaboliques qui contribuent à la pathogenèse du diabète demeure un grand défi du fait de leur complexité. L'utilisation de méthodes intégratives dans ce domaine de recherche est en pleine expansion et s'avère prometteuse pour répondre à cette vaste problématique (Bain et al, 2009). Cependant, leur association avec des méthodes ciblées plus conventionnelles, est nécessaire pour appréhender au mieux les vastes matrices de données générées par la métabolomique, en extraire l'information utile et interprétable, et *in fine* le sens biologique associé.

Dans cette perspective, toujours en utilisant le modèle présenté dans la figure 5 du chapitre 1 et sur les animaux dont nous avons étudié le comportement alimentaire dans le premier article, nous avons procédé, dans un premier temps, à la mesure de l'insulino-sensibilité *in vivo* à l'âge adulte. Nous avons ainsi étudié l'insulino-sensibilité des rats dans leur vie de jeune adulte, période durant laquelle la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline est augmentée, ainsi qu'à un âge plus avancé. Pour la première mesure, nous avons réalisé un test oral de tolérance au glucose afin de calculer un indice d'insulino-sensibilité (Gutt et al, 2000). Pour la seconde mesure, nous avons effectué un test de clamp hyperinsulinémique-euglycémique sur des animaux nourris par un régime standard ou hypercalorique de type Occidental. Les capacités sécrétoires des cellules β du pancréas à ces différents âges ont été évaluées par le biais de l'indice du HOMA- β défini par Matthews et al. (Matthews et al, 1985).

Afin d'identifier un maximum de composés et de voies métaboliques qui pourraient donner un nouvel éclairage sur les altérations précoces du métabolisme énergétique dans le cadre de la programmation métabolique, nous avons effectué une analyse métabolomique semi-quantitative au niveau plasmatique. De même, nous avons déterminé le profil des acylcarnitines au niveau systémique, reflet du catabolisme des acides gras et des acides

aminés. Ceci du fait que les évidences quant à la programmation d'un dysfonctionnement des mitochondries par un environnement nutritionnel précoce délétère s'accumulent (cf. section 3.3 du chapitre 1).

Enfin, le foie étant un véritable carrefour métabolique et jouant un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique, nous avons évalué sa teneur en lipides ainsi que l'expression de différents transcripts impliqués dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides, dans la signalisation de l'insuline ou étant des facteurs de transcription intervenant dans l'homéostasie énergétique.

Résultats marquants

À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui se soit intéressée aux altérations métaboliques, aussi étendues que possible, associées aux changements de la sensibilité à l'insuline et aux capacités sécrétoires en insuline des cellules β du pancréas chez des rats adultes soumis à une programmation métabolique à un âge précoce et exposés à un régime standard ou hypercalorique. Les résultats de cette seconde étude, soumis dans un journal de diabétologie (Diabetes), montrent que, comme le comportement alimentaire, la régulation du métabolisme et la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques chez la descendance mâle adulte de rates exposées à un régime hypoprotidique en période périnatale sont spécifiques à des trajectoires de croissance pré- et postnatale données. Les adaptations du métabolisme, en termes de prise de poids et d'adiposité à l'âge adulte face à une ingestion chronique d'un régime hypercalorique, sont également dépendantes de la croissance précoce (déjà décrite dans le premier article), et probablement de la trajectoire métabolique associée (article 4 présenté dans les perspectives du chapitre 3).

Cette étude confirme que l'insulino-sensibilité périphérique est augmentée chez le jeune adulte quelque soit la fenêtre de temps précoce durant laquelle la mère aura été nourrie avec un régime restreint en protéines (gestation/lactation). Ces résultats soutiennent également les preuves expérimentales avancées par d'autres équipes sur le fait qu'un retard de croissance intra-utérin est associé à une diminution des capacités sécrétoires en insuline de l'individu.

Cette étude révèle cependant de nouveaux éléments sur le métabolisme global et sa programmation chez la descendance mâle de rates soumises à un régime hypoprotidique en période périnatale :

1) Il s'avère que les rats nés avec un retard de croissance intra-utérin et ayant fait l'expérience d'un rattrapage de croissance pendant la période d'allaitement présentent, sous les deux régimes, une altération de changement de substrat énergétique en période de jeûne. En effet, au regard des concentrations circulantes des substrats énergétiques (corps cétoniques, AGNE), des profils en acylcarnitines, des données issues du métabolome (citrate, métabolites biliaires) et des profils d'expression des gènes hépatiques impliqués dans la régulation du métabolisme, la β -oxydation des acides gras apparaît diminuée chez ces individus. Cette adaptation pourrait en partie expliquer l'augmentation plus importante d'adiposité observée dans ce groupe d'animaux. Malgré la diminution de la β -oxydation des acides gras, les individus semblent présenter une augmentation de la gluconéogenèse hépatique. Cette interprétation repose sur les profils en acides aminés issus du métabolome, les concentrations plasmatiques en lactate et sur les niveaux d'expression de certains gènes hépatique. Ces observations sur le métabolisme sont associées, à l'âge auquel ont été étudiés les animaux (un peu plus de 7 mois et demi), à une absence d'insulino-résistance globale des tissus périphériques.

2) Les individus nés avec un RCIU mais ayant eu une croissance lente au cours de l'allaitement ne présentent pas les mêmes adaptations métaboliques que ceux ayant fait l'expérience d'une croissance postnatale accélérée, bien qu'ils aient également une accréation adipeuse importante une fois exposés à un régime de type Occidental. La β -oxydation mitochondriale de ces individus, lorsqu'ils sont exposés au régime hypercalorique, semble être altérée comme en témoignent les profils en acylcarnitines. Cette altération est conjointe à la perte d'hypersensibilité à l'insuline des tissus périphériques de ces individus qui est préservée au même âge sous un régime standard de laboratoire.

3) Enfin, les individus ayant eu une croissance ralentie uniquement en période postnatale présentent un phénotype atypique dont l'absence d'accréation adipeuse malgré l'ingestion chronique d'un régime riche en graisse et en sucre (article 1) avait également été montrée par d'autres équipes de recherche, mais dont les adaptations métaboliques restent peu décrites. Le métabolome systémique de ces individus ne semble pas être profondément marqué par l'histoire périnatale. Cependant, les adaptations métaboliques des organes s'avèrent fortement modifiées comme le soulignent d'une part la réponse hépatique marquée, entre autres, par une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, et d'autre part, l'oxydation globale des acides gras, comme le suggèrent les profils en acylcarnitines et

l'augmentation de l'insulino-sensibilité globale. Ces modifications du métabolisme sont associées à un maintien de l'hypersensibilité des tissus périphériques et même d'une augmentation de cette sensibilité ainsi que des capacités sécrétoires des cellules β du pancréas suite à l'exposition au régime de type Occidental.

En conclusion, par cette étude, nous montrons pour la première fois les adaptations sur le long terme du métabolisme global et hépatique suite à une programmation métabolique provoquée par la restriction protéique maternelle en période périnatale (Figure 20). Cette étude permet d'approfondir les connaissances sur les rôles distincts des fenêtres de temps précoces sur la détermination des adaptations futures du métabolisme et leur caractère délétère ou non sur la sensibilité du corps entier à l'insuline. Nos résultats ne permettent pas de cibler spécifiquement un niveau d'altération mais révèlent des processus touchants un ensemble de voies métaboliques impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique au niveau systémique. Enfin, il apparaît de nouveau que les périodes de gestation et de lactation représentent des fenêtres de temps clefs dans l'étude des mécanismes impliqués, cette fois-ci, dans la mise en place de la régulation de l'homéostasie énergétique.

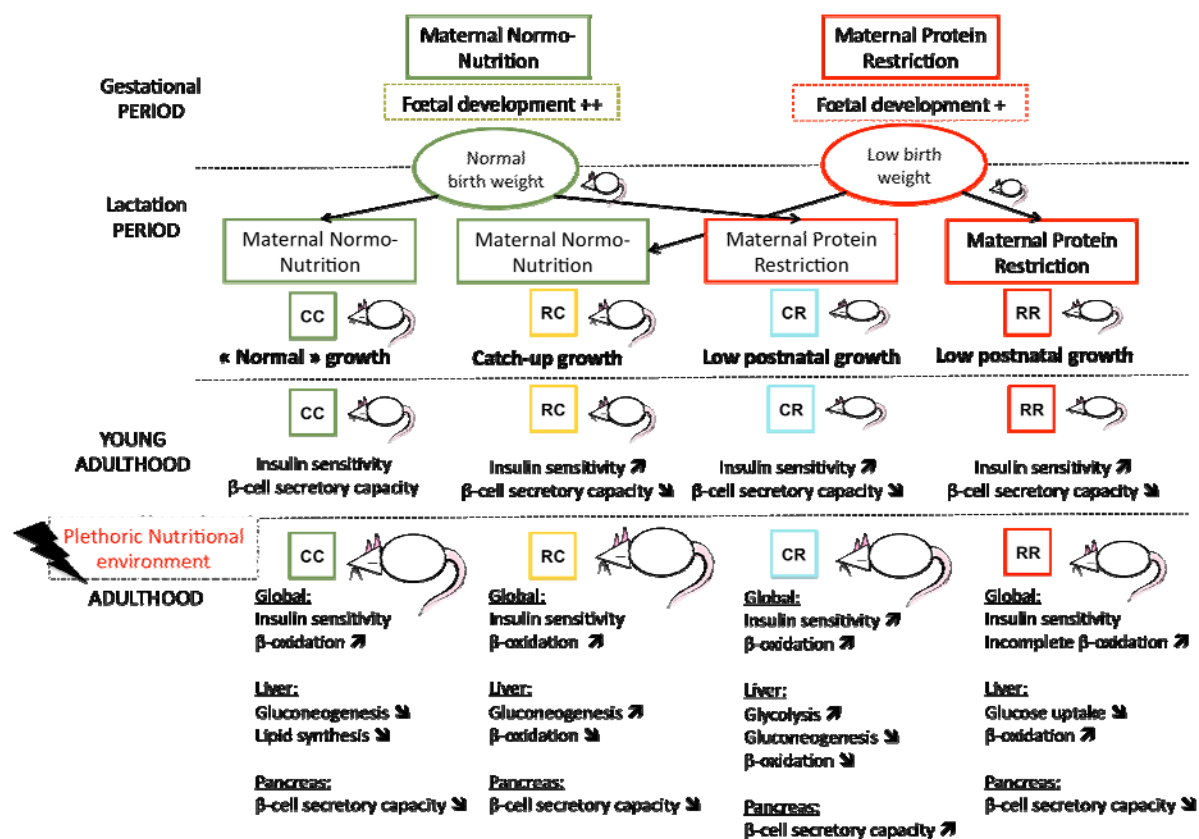


Figure 20. Schéma bilan des observations extraites de l'étude 2 et propositions sur les altérations du métabolisme énergétique de rats adultes mâles ayant eu une modification de trajectoire de croissance pré- et/ou postnatale par modulation de l'apport protéique maternelle en période périnatale.

Time-window dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in male offspring exposed to Western diet in adulthood

A. Martin Agnoux^{1,2}, J.-P. Antignac³, G. Simard^{4,5,6}, G. Poupeau^{1,2}, D. Darmaun^{1,2}, P. Parnet^{1,2}, M.-C. Alexandre-Gouabau^{1,2}

¹ INRA, UMR1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Institut des maladies de l'appareil digestif (IMAD), Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest (CRNH), Nantes, France

² Université de Nantes, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Institut des maladies de l'appareil digestif (IMAD), Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest (CRNH), Nantes, France

³ LUNAM université, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), USC INRA 1329, Nantes, France.

⁴ LUNAM Université, Angers, France.

⁵ INSERM U1063, Angers, France.

⁶ Université d'Angers, CHU Angers, Department of Biochemistry, Angers, France.

* To whom correspondence should be addressed: Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1280, Laboratoire de Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, 44093 Nantes Cedex 1, France Phone : 33 2 53 48 20 12 ; Fax : 33 2 53 48 20 03 ; E-mail: Marie-Cecile.Alexandre-Gouabau@univ-nantes.fr

Short title: Nutritional programming and energy homeostasis

Keywords: **metabolic programming, insulin clamp, energy metabolism**

Abstract

Epidemiological and experimental evidence suggests that a sub-optimal environment during perinatal life may program offspring susceptibility to the subsequent development of metabolic syndrome and Type 2 diabetes in a time-window specific manner. We performed a hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in adult male rats born from dams restricted in protein during gestation and/or lactation, and fed either a normal- or a Western diet (WD) starting at 5 months of age. An untargeted mass spectrometric-based metabolomic approach was combined with targeted acylcarnitines profiling and liver gene expression pattern to characterize metabolic signatures in the offspring. Impaired insulin secretion was the first alteration observed in the offspring of prenatally protein-restricted dams, followed by impaired fuel oxidation. Offspring from postnatally protein-restricted mothers had low fat accretion through adulthood and preserved insulin sensitivity despite exposure to a WD. Fatty acid and amino acid oxidation, gluconeogenesis, and bile acid metabolism were impacted differently, depending on the time-window of perinatal manipulation. Altogether, our findings suggest a molecular link between insulin sensitivity and (i) mitochondrial overload and/or substrate oxidation inflexibility in offspring from prenatally protein-restricted mothers or (ii) low fat accretion and specific hepatic adaptation to WD in offspring exposed only postnatally to maternal undernutrition.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is becoming a worldwide epidemic that may affect around 4.4% of the world's population by 2030 (1). It results from a complex set of interactions between genetic—contributing less than 1% of disease risk (2)—and environmental factors, particularly perinatal nutrition. Individuals born with a low birth weight due to an intrauterine growth restriction (IUGR) are exposed to a 6-fold increase in the risk of developing T2DM and are 18 times more likely to present metabolic syndrome in adult life than individuals born with a normal birth weight (3). Such observations led Hales and Barker to propose the “Thrifty Phenotype” Hypothesis also known as Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) or metabolic programming. This postulates that poor nutrition during critical periods early in development triggers adaptations that improve offspring survival but have adverse metabolic consequences in adulthood including increased hepatic glucose output, insulin resistance (IR), and impaired insulin secretion, three hallmarks of T2DM. The latter are associated with altered regulation of glucose and lipid metabolism in several tissues such as liver, skeletal muscle, and pancreas (4; 5).

Although the exact mechanisms underlying these metabolic disorders are not yet fully understood, emerging evidence suggests that mitochondrial biogenesis and/or activity (6) and metabolic inflexibility, defined as an inappropriate adjustment of mitochondrial fuel selection in response to nutritional signals (7), might contribute to T2DM. Moreover, we recently showed alterations in fatty acid metabolism in adult male rats born from protein-restricted mothers (8; 9). We therefore postulated that perinatal protein deprivation could permanently impact mitochondrial fuel oxidation with specific effects on insulin sensitivity (IS) depending on the time-window of exposure (i.e. gestation and/or lactation). To address that hypothesis, the current study used a rat model of IUGR induced by maternal dietary protein restriction, that mimics the effects of utero-placental insufficiency, the most common cause of IUGR in Western countries (10-12).

More recent than other global genotyping/phenotyping approaches, metabolomics is emerging as a valuable way for generating new descriptors and/or mechanistic information related to complex biological processes as T2DM development (13; 14). Herein, an untargeted mass spectrometric-based metabolomic approach was combined with targeted measurements to gain a broader understanding of metabolic and physiological outcomes in programming (8). Fasting blood biochemical and acylcarnitine profile that reflect fatty acid and amino acid oxidation (15), combined with insulin sensitivity test and body composition were examined in rats fed a balanced or an unbalanced diet (16). Because the liver is a key organ in glucose and

lipid metabolism and the only site of ketone body biosynthesis, we also analysed the hepatic expression of genes involved in energy homeostasis.

To our knowledge, this work is the first integrative study using metabolomics, acylcarnitines pattern, and hyperinsulinemic-euglycemic clamp to address the long-term effects of perinatal ‘programming’. We found evidence for alterations in mitochondrial fatty acid β -oxidation that could explain the progressive impairment in energy homeostasis and insulin sensitivity following a nutritional insult inflicted in perinatal time-window.

Material and Methods

Animal experiments, housing and diets

The experimental protocol applied (CEEAA.2011.4) and previously described in detail (12), was carried out in accordance with the current European regulation regarding the protection of animals used for experiments. Briefly, virgin female Sprague Dawley rats were time mated and received either *ad libitum* control chow (C, 20% protein) or an isocaloric, low-protein (R, 8% protein) diet throughout gestation and lactation. At birth, litter size was adjusted to eight male pups per dam. Pups born from protein-restricted dams were randomly attributed to C (RC group) or to R dams (RR) for lactation (Fig.1A). During suckling period, pups born from control dams were adopted by C (CC) or R dams (CR). At D164, rats were split in two groups, one maintained on chow diet and the second fed a Western diet (WD) containing 17% protein, 43% carbohydrate (10.2% corn-starch, 89.8% sucrose/maltodextrin) and 41% fat (Research diet, New Brunswick, NJ) for 10 weeks, to obtain 8 experimental groups: CC, CCWD, RC, RCWD, RR, RRWD, CR and CRWD. Experimental design is depicted in Figure 1B.

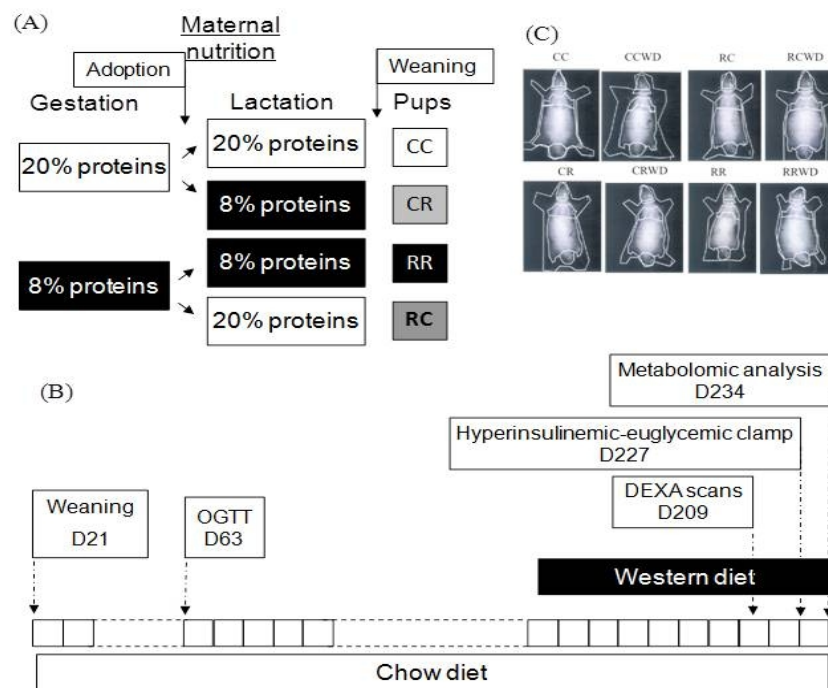


Figure 1. (A) Schematic diagram for the experimental perinatally manipulated group of rats. (B) Time schedule design for the monitoring physiological, metabolic and insulin sensitivity measurements. OGTT: Oral glucose tolerance test; DEXA: Dual-energy X-ray absorptiometry. (C) Images of whole body scans obtained by DEXA technique of fat mass and fat free mass in chow or WD fed CC, RC, CR and RR rats at D209 after 7.5 weeks of high energy diet for the WD groups. Lines delimited scans of total body fat mass and abdominal (AFM), epididymal (EFM) and brown (BFM) fat mass following anatomical fat-tissue distribution (56). N=5-7 per group.

Feeding and anthropometric parameters

Relative food intake (kcal/g of BW) and food efficiency (g of BW gain/kcal) were calculated between D164 and D220 for each group (12). Body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) (Atlantic Bone screen platform, Nantes, France) at D209 after 7.5 weeks of high-energy diet for WD-rats. Before scanning, animals were anesthetized with Dorbene vet® (20µg/kg, Pfizer-Centravet, Plancoët, France). DEXA subdivides body composition into bone mineral mass, fat mass, and lean body mass.

Insulin sensitivity and β -cell secretory capacity

Whole-body insulin sensitivity (IS) was assessed at D63 and D227. At D63 a non-invasive method was preferred to avoid the risk of mortality associated with surgery since both techniques were applied on the same animals.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

At D63, after a 15h overnight fast, all rats received a 1g/kg BW dose of glucose by gavage. Blood samples were collected from tail vein to determine blood glucose and insulin levels. Peripheral IS during OGTT was estimated using $ISI_{0,120}$ (17) index.

Hyperinsulinemic-euglycemic clamp

At D227, after 9 weeks of receiving either the control or the Western diet, and after a 15h overnight fast, rats from all groups were anesthetized with isoflurane/oxygen, basal glucose level was determined from tail vein blood before surgery, and a venous catheter was inserted into a jugular vein. Rats then underwent a 150 min hyperinsulinemic-euglycemic clamp with a 1 min 72 mU/kg insulin bolus followed by a continuous, intravenous infusion of human insulin (Actrapid® Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) at a constant rate of 18 mU/kg per min (18). The rate of infusion of a 20% glucose solution (Braun Medical SAS, Boulogne, France) was adjusted according to blood glucose measured at 5 min intervals throughout the 150-min clamp so as to maintain basal plasma glucose levels. NEFA levels were measured during the last 20 min of the clamp. IS was calculated as the rate of infused glucose normalized to lean body mass (mg/kgLBM/min) during the steady-state phase of the clamp (19).

Homeostasis model assessment (HOMA) of β -cells

The insulin secretory capacity of β -cells was estimated before the OGTT (D63), and before sacrifice (D234) using HOMA- β index (20).

Targeted Metabolic variables

At D234, after a 15h overnight fast, blood glucose levels from vein tail were monitored on vigil animals using a glucometer (Accu-CheckH active®, Roche Diagnostics). Then animals were sacrificed using inhaled CO₂ followed by decapitation. Cardiac blood samples were collected in EDTA-tubes (Pfizer-Centravet, Plancoët, France) and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed for: non-esterified fatty acids (NEFA) (Wako NEFA-HR, Neuss, Germany), triacylglycerol, cholesterol (Biomérieux TG PAP1000_Cholestérol RTU, France), ketone bodies (Wako Autokit total ketone bodies, Neuss, Germany), lactate (Biosentec, D/L lactic acid kit, France) and insulin (Eurobio, Rat Insulin ELISA kit, France). Free carnitine and acylcarnitines analysis were determined after derivatization to their respective butyl-ester forms using isotope dilution electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) as described (21).

Non-targeted plasma phenotyping by LC-HRMS metabolomic

The used MS-based metabolomic fingerprinting workflow was previously applied and described by our group (8; 22). At D234, fasted plasma samples of all rats, were submitted to a preliminary filtration step (10 KD) before their analysis by reverse phase liquid chromatography coupled to high-resolution MS (HPLC-ESI-HRMS) using an Orbital trap instrument operating in positive or negative electrospray ionization mode and in full scan acquisition mode at a 30,000 resolution FWHM. Annotation of the generated metabolomic profiles and subsequent identification of putative metabolites/biomarkers of interest were achieved using an in-house reference databank (23).

RNA isolation and Real time RT-PCR

Total RNA was extracted from frozen liver in 234-day-old rats with TRIzol reagent according to manufacturer's instructions (Ambion RNA, Life technologies, France). mRNA of genes implicated in glucose metabolism (LPK, GLUT2, PEPCK, LDHb), lipid metabolism (FASN, ACC1, FABP1, CPT1a, Mylcd, Acacb, HMGcl), insulin signalling (InsR2) and transcription factors involved in the regulation of these biological pathways (ChREBP FOXO1, PGC1 α , SIRT1, PPAR α , Srebf1) were quantified by real time RT-PCR. Primers were designed on the basis of the sequences available at the NCBI gene bank (supplemental Table S1) using the 'Perlprimer' program (v.1.1.17) and synthesized by Eurogentec (San Diego, USA). CC was the calibrator group under chow diet. CC, RC, RR and CR were used as the calibrator groups for the CCWD, RCWD, RRWD and CRWD respectively.

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM in tables and figures. Differences among groups were analyzed by Mann-Whitney U-test using GraphPad Prism® software version 5.00. Metabolomic data were processed using the open-source XCMS® (8). Processed data were analyzed by multivariate statistical analysis, using SIMCA-P⁺® software (version 12, Umetrics Inc., Umeå, Sweden). Supervized Partial-Least-Square Discriminant-Analysis (PLS-DA) evaluated the contribution of metabolites in the distribution of rats. Differences with $p < 0.05$ were regarded as significant.

Results

Phenotyping consequences of perinatal programming

We previously showed that compared with CC, IUGR animals had a significantly lower birth weight (circa 7%), remained thinner when nursed by dams fed a low protein diet (RR), and caught-up with controls at D6 when cross-fostered by normally fed mothers (RC) (12). Control pups nursed by dams fed a low protein diet (CR) had a lower body weight than CC pups at D6. Adult IUGR rats fed a chow diet had a lower weight, adiposity and higher lean body mass than CC although food intake was similar (Table 1). CR rats exhibited lower body weight than CC but comparable lean body mass and adiposity. Fasting circulating levels were higher for glucose but similar for insulin, NEFA and cholesterol in RC, RR and CR compared with CC. Both IUGR groups had triglyceride concentrations similar to those in CC rats whereas levels were lower in CR. Circulating ketone body and lactate levels did not differ between CC, RR and CR groups but were lower for RC than CC.

Chronic ingestion of a WD tended to increase body weight, whole-body and abdominal adiposity in all groups, although only the two IUGR groups were significantly heavier and demonstrated higher feeding efficiency, compared with their chow-fed counterparts (Table 1, Fig.1C). Surprisingly, no change in lean and fat mass nor in feeding efficiency was observed between CR and CRWD despite higher relative food intake. These findings were associated with similar fasting plasma glucose, insulin, lactate and triglyceride levels, and higher cholesterol and ketone body in all groups of rats, compared with their chow-fed counterparts. Lower body weight was only maintained in RRWD rats compared with CCWD. RCWD had significantly lower circulating lactate and ketone body levels than CCWD while CRWD sustained lower triglyceride concentrations than CCWD. Both IUGRWD groups presented higher fasting NEFA concentrations than CCWD. Neither perinatal nutrition nor adult diet had any impact on bone mineral density.

Postnatal nursing by a protein-restricted mother enhances insulin sensitivity

IS was assessed using OGTT in young adulthood (D63), and using a hyperinsulinemic-euglycemic clamp during advanced adulthood (D227) under chow or Western diet. The 3 perinatally manipulated groups showed improved peripheral IS as evidenced by increased $ISI_{0,120}$ index compared with CC (Fig.2A) despite similar fasting glucose and insulin levels (data not shown at D63) and decreased pancreatic insulin secretory capacity (with an NS trend towards a lower HOMA- β) (Fig.2B). At D227, the hyperinsulinemic-euglycemic clamp test

Table 1. Body weight, body composition, and fasting metabolic data measured in 234-day-old CC, RC, RR and CR rats fed a chow diet or a Western diet

Parameter (n=5-7)	CC	RC	RR	CR	CCWD	RCWD	RRWD	CRWD
Body characteristics								
BW (g)	715 ± 26	632 ± 22*	594 ± 21*	630 ± 24*	755.3 ± 18.8	698.5 ± 36.0	643.2 ± 25.5**	708.4 ± 36.9
FFM (%)	62.3 ± 1.1	68.3 ± 0.8**	69.0 ± 1.3**	65.8 ± 2.5	57.6 ± 1.1b	63.0 ± 2.3b	56.7 ± 1.6b	62.9 ± 3.8
TWFM (%)	27.4 ± 0.8	22.4 ± 0.8**	21.7 ± 1.3**	23.1 ± 1.9t	30.8 ± 1.34	26.9 ± 1.95b	30.6 ± 1.28b	25.1 ± 2.61
AFM (%)	20.5 ± 0.92	15.9 ± 0.54**	16.1 ± 1.19	17.1 ± 1.65	23.2 ± 1.28	20.5 ± 1.65b	23.1 ± 1.06b	18.6 ± 1.96
EFM (%)	2.6 ± 0.1	2.0 ± 0.1*	2.0 ± 0.1**	2.0 ± 0.1**	2.9 ± 0.06	2.3 ± 0.20	2.8 ± 0.19b	2.2 ± 0.36
BFM (%)	3.48 ± 0.28	4.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2\$#	4.4 ± 0.4	4.7 ± 0.28b	4.4 ± 0.49	4.4 ± 0.13b	4.7 ± 0.72
BMD (g/cm ²)	0.25 ± 0.004	0.24 ± 0.004	0.24 ± 0.005	0.24 ± 0.004	0.25 ± 0.007	0.25 ± 0.004	0.25 ± 0.003	0.24 ± 0.006
Feeding parameters								
Food intake (kcal/g BW)	0.96 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.98 ± 0.04	0.95 ± 0.02	1.17 ± 0.06b	1.22 ± 0.03b#	1.22 ± 0.04b	1.33 ± 0.03b*
Efficiency (BWG/kcal)	9.8 ± 1.0	7.4 ± 0.7	6.07 ± 0.6*#	9.4 ± 0.8	10.1 ± 1.2	10.9 ± 1.2b	10.0 ± 1.5b	8.4 ± 1.3
Liver								
Liver/BW (%)	2.89± 0.10	2.64± 0.06	2.74± 0.08	2.59± 0.03	3.11± 0.15	2.87 ± 0.04b	3.12± 0.18	3.00± 0.08b
Liver TAG/BW (%)	3.51± 0.79	3.79± 1.32	3.50 ± 1.32	3.04 ± 0.93	7.10± 3.35	4.75± 1.11	2.93 ± 1.53	3.08 ± 0.74
Plasma concentrations								
Glucose (mmol/L)	5.22 ± 0.08	5.60 ± 0.11*	5.73 ± 0.14*	5.59 ± 0.08*	5.80 ± 0.33	5.62 ± 0.13	5.48 ± 0.21	5.74 ± 0.16
Insulin (pmol/L)	211.1 ± 27.5	191.0 ± 19.4	197.4 ± 24.3	182.8 ± 36.6	264.8 ± 68.3	150.5 ± 22.6	188.7 ± 33.8	246.9 ± 55.2
Lactate (mmol/L)	8.03 ± 0.63	5.97 ± 0.53*	7.01 ± 0.74	8.33 ± 0.55\$	8.22 ± 0.47	5.76 ± 0.52*	6.94 ± 0.62	8.14 ± 0.96\$
NEFA (mmol/L)	0.68 ± 0.08	0.65 ± 0.09	0.73 ± 0.06	0.53 ± 0.06	0.50 ± 0.05	0.73 ± 0.09*	0.64 ± 0.06*	0.62 ± 0.06
Ketone bodies (μmol/L)	1163 ± 97	767 ± 118*	1067 ± 166	918 ± 150	1635 ± 129b	1189 ± 99b*	1708 ± 140b\$\$	1466 ± 105b
TAG (μmol/L)	0.24 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.01*	0.22 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02*
Cholesterol (μmol/L)	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.25 ± 0.02b	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01b	0.23 ± 0.01b

BW: Body weight - BWG: Body weight gain – BMD: Bone mineral density – Percentage of free (FFM), total white (TWFM), abdominal (AFM), epididymal (EFM) and brown (BFM) fat mass were assessed at D209 by DEXA according to anatomical tissue distribution (56).

Values are means ± SEM

*, ** vs CC, p<0.05 or p<0.01 respectively for one type of diet_\$, \$\$ vs RC, p<0.05 or p<0.01 respectively for one type of diet_#, \$\$\$ vs CR, p<0.05 or p<0.01 for type of diet

Means labelled with a “b” are significantly different at 5% for one group of rats between chow diet or Western diet.

showed increased whole-body IS only in RR and CR rats, compared with CC (Fig.2C). HOMA- β was significantly lower for RC, RR and CR rats compared with CC (Fig.2D). Chronic exposure to a WD induced a significant decrease in β -cell insulin secretory capacity in CCWD and RCWD rats (Fig.2D) while HOMA- β was elevated for CRWD (not significant) and persistently low for RRWD. This was associated with unchanged whole-body IS for CCWD, RCWD and RRWD compared with their chow-fed counterparts (Fig.2C). However, plasma NEFA concentrations during the steady-state period of the clamp were significantly increased in CCWD and RCWD (Fig.2E). Interestingly, CRWD displayed a significant increase in whole-body IS compared with CCWD, RCWD and their chow-fed counterparts.

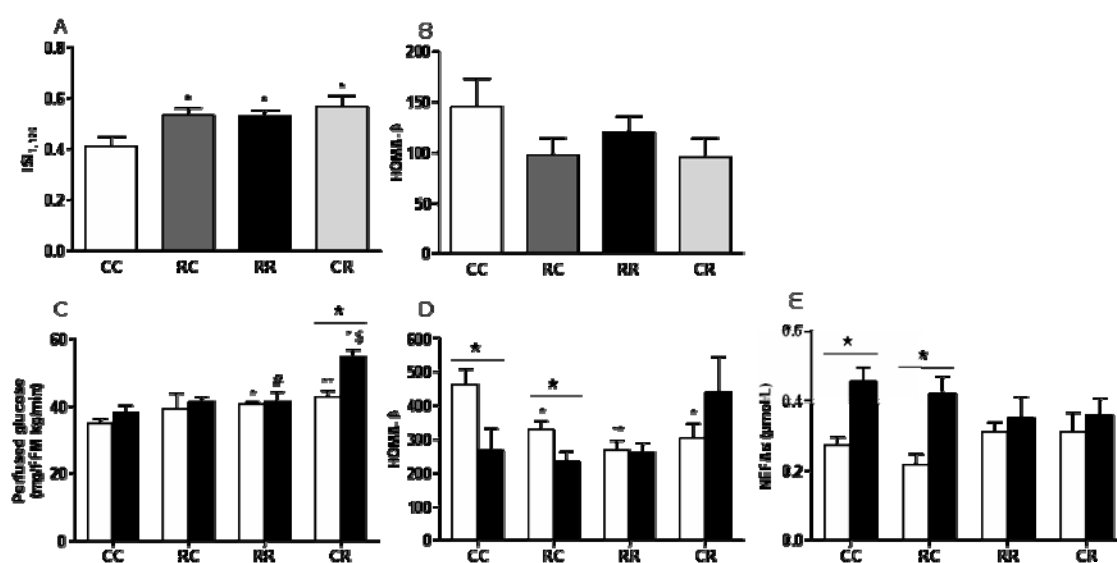


Figure 2. (A) Peripheral insulin sensitivity ($ISI_{0,120}$) at 63 days in rats fed a control diet; (B) β -cell secretory capacity index (HOMA- β) measured on CC, RC, RR and CR animals at 63 days in rats fed a control diet. (C) Whole-body insulin sensitivity expressed as glucose disposal rate, and (E) NEFA levels at the steady state of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp performed at 227 days; (D) β -cells secretory capacity index (HOMA- β) at D234 of CC, RC, RR and CR animals fed with a chow diet or a Western diet.

(i) $ISI_{0,120} = m / \text{MPG} / \log(\text{MSI})$, where MPG is mean plasma glucose (mg/L, mean of the 0 and 120 glucose values from the OGTT), MSI (mean serum insulin, mU/L) and m (mg/min) = glucose load (mg) + (0 min glucose – 120 min glucose (mg/L)) $\times$ 0.19 (glucose space, L) $\times$ BW (kg)/120 min. (ii) $\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{FPI (mU/L)} / (\text{FPG (mmol/L)} - 3.5)$, where FPG and FPI are fasting plasma glucose (mg/L) and insulin (mU/L) levels.

Data represent means $\pm$ SEM from 6 to 8 animals per group. White bars, chow fed animals. Black bars, WD fed animals. *, ** RC, RR and CR vs CC, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively. # RR vs CR, $p < 0.05$. ★ chow diet vs Western diet, $p < 0.05$.

Perinatal maternal protein restriction is associated with impaired fatty acid and amino acid oxidation

At D243, under chow diet, fasting free- and C2-carnitine (derived from acetyl-CoA bound to carnitine), as well as total-, short-, medium- and long-chain acylcarnitines concentrations were similar between all rats (Fig.3) except for the long-chain acylcarnitines since they were lower in RC compared with CC and RR. Furthermore, RC presented lower levels of C3- and C4-carnitine, derived from fatty acid and amino acid catabolism, than CR and CC (Table 2).

WD reduced free carnitine in RCWD, and short-chain acylcarnitines levels in CCWD, RCWD, and CRWD compared with their chow-fed counterparts. Indeed, CCWD presented lower levels of C2-carnitine as observed in RCWD and CRWD, of C3-carnitine as CRWD, both groups reaching lower concentrations than RRWD, and of C4- and C5-carnitine, the latter resulting from leucine catabolism and being lower than IUGRWD rats. In contrast, short-chain acylcarnitines remained constant in RRWD and more elevated than the 3 other groups. Indeed, RRWD displayed increased C3DC- (malonyl byproduct) and C4DC-carnitine levels compared with RR, RCWD and CRWD. Additionally, RRWD and CRWD presented a rise in medium- and long-chain acylcarnitines levels, such as a 2-fold in C12-carnitine and more than a 3-fold increase in C16OH-carnitine, the later also being observed in RCWD rats. Finally, RCWD had lower C12- and C18-carnitine levels than RRWD and CRWD.

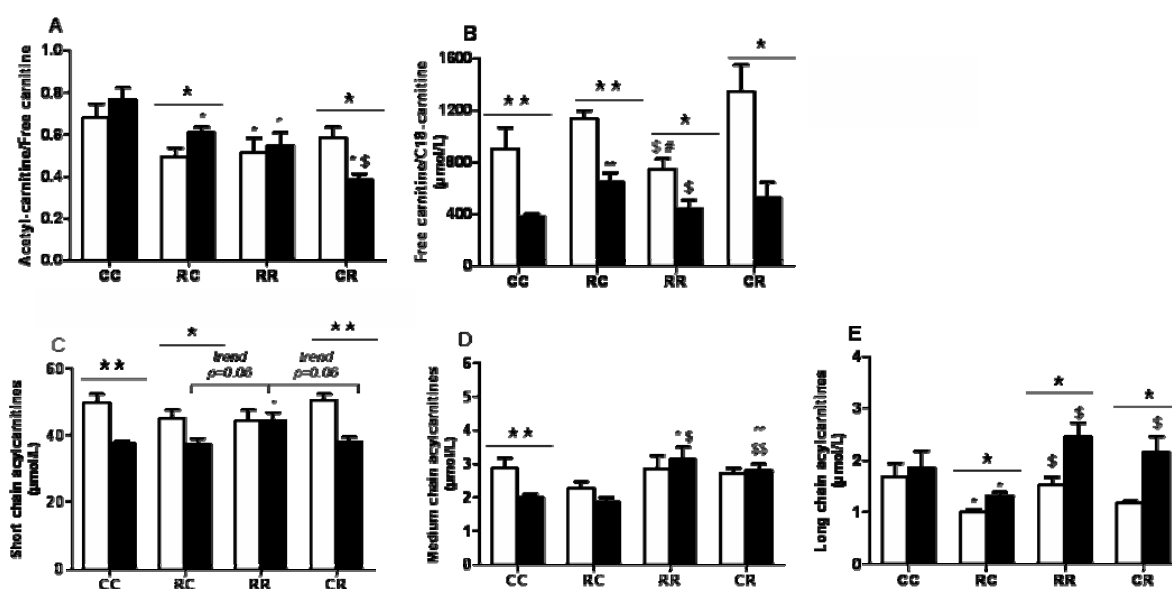


Figure 3. Carnitine and acyl-carnitine profiles at D234 in CC, RC, RR and CR animals fed with a chow diet or a Western diet. (A) Acetyl-carnitine/Free carnitine ratio and (B) Free carnitine/C18-carnitine allowing estimation of complete long chain fatty acids β -oxidation.

Short (C), medium (D) and long (E) chain acyl-carnitine refer to the sum of C2 to C3, C4 to C10 and C12 to C18 respectively.

White bars, chow fed animals. Black bars, WD fed animals. N=5 animals per group.

*, ** RC, RR and CR vs CC, $p<0.05$ and $p<0.01$ respectively. \$, \$\$ RR and CR vs RC, $p<0.05$ and $p<0.01$ respectively. # RR vs CR, $p<0.05$. ★ chow diet vs western diet, $p<0.05$. ★ ★ chow diet vs Western diet, $p<0.01$.

Specific metabolic signature associated to IUGR and postnatal catch-up growth

An untargeted metabolomic analysis was applied to plasma samples collected in adult rats to identify the metabolic pathways altered by perinatal programming.

Specific metabolic signatures in RC were highlighted by annotated metabolites involved in energy or nucleotide metabolism (Table 3). Under chow diet, and compared with CC, RC rats had lower branched-chain amino acids (valine, leucine/isoleucine), aromatic amino acids (tyrosine and tryptophan) and other gluconeogenic amino acids (glycine, serine), and higher succinate levels, a TCA cycle intermediate.

The PLS-DA performed in all generated metabolomic profiles revealed a clear separation of adult rats according to their latter diet but independently of the perinatal nutrition (Fig.S1). Whatever the group, a significant decrease in cholic and hippuric acid was observed after WD-exposure. Specifically, WD induced a significant 2-fold increase in arginine levels for RRWD and in succinate for CCWD, RRWD and CRWD compared with their chow-fed counterparts. RCWD presented higher citrate but lower asparagine/aspartate levels than their chow-fed counterparts, and lower nicotinic acid, 5-hydroxy-indole-3-acetic acid, inosine, glycine and glutamate than CCWD. Lower taurine and higher taurochloric acid abundances were observed in RCWD, CRWD and RRWD compared with CCWD.

Perinatal maternal protein restriction modify energy metabolism gene expression

Compared with CC, perinatal maternal protein restriction resulted in a reduction in hepatic transcripts involved in glucose metabolism such as PEPCK in RC, LDHb, LPK and InsR2 ($p=0.065$) and GLUT2 in CR; in lipid metabolism such as ACC1 in CR and RC, Mlycd and HMGcl in RC; or in transcription factors involved in the regulation of energy fuel metabolism such as ChrEBP, SIRT1, FOXO1 and Srebf1 in CR (Fig.S2).

WD induced a significant decrease in hepatic expression of the gluconeogenic enzyme PEPCK and an increase of the glycolytic enzyme LPK in CRWD. Genes regulating glucose transport (GLUT2), insulin signalling (InsR2) and transcription factors involved in both pathways were also increased in CRWD (ChREBP, PGC1 α , SIRT1, FOXO1). In contrast,

Table 2. Fasting plasma carnitine ester concentrations determined in CC, RC, RR and CR 234-day-old rats fed a chow diet or Western diet

Analyte (μmol/l) n=5	CC	RC	RR	CR	CCWD	RCWD	RRWD	CRWD
Total carnitine	129.8 ± 11.7	136.5 ± 5.26	138.8 ± 12.8	140.9 ± 3.09	91.1 ± 3.64b	101.2 ± 3.23b##	127.6 ± 12.0*	133.3 ± 6.73**
Free carnitine	74.2 ± 9.73	87.1 ± 4.77	89.3 ± 10.6	85.7 ± 4.22	48.5 ± 3.55	59.7 ± 2.03b*#	78.6 ± 10.1*	88.8 ± 7.54**
Total acylcarnitine	55.6 ± 2.56	49.4 ± 2.83	49.6 ± 3.81	55.2 ± 1.68	42.0 ± 1.06b	41.6 ± 1.84	51.9 ± 2.90*\$#	44.5 ± 1.84b
Acetyl-CN (C2)	48.2 ± 2.49	44.0 ± 2.49	42.8 ± 3.05	49.1 ± 1.79	36.5 ± 0.68b	36.3 ± 1.76b	40.7 ± 3.07	36.9 ± 1.58b
Propionyl-CN (C3)	1.55 ± 0.22	1.04 ± 0.07##	1.45 ± 0.29	1.38 ± 0.04	1.01 ± 0.11b	1.05 ± 0.05	1.27 ± 0.09*#	0.99 ± 0.12b
Butyryl-CN (C4)	2.10 ± 0.25	1.40 ± 0.18*	1.95 ± 0.36	1.88 ± 0.17	1.38 ± 0.08b	1.14 ± 0.13##	2.00 ± 0.34	2.02 ± 0.15**
Tiglyl-CN (C5:1)	0.019 ± 0.005	0.043 ± 0.011*	0.038 ± 0.011	0.041 ± 0.012	0.037 ± 0.011	0.044 ± 0.010	0.048 ± 0.009	0.088 ± 0.025
Isovaleryl-CN (C5)	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.43 ± 0.06	0.38 ± 0.03	0.25 ± 0.02b	0.36 ± 0.02*	0.43 ± 0.06*	0.32 ± 0.04
3-OH-Isovaleryl-CN (C5OH)	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.03\$	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.03*
Malonyl-CN (C3DC)	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.19 ± 0.01b\$#	0.15 ± 0.01
Methylmalonyl-CN (C4DC)	0.43 ± 0.10	0.18 ± 0.04*	0.28 ± 0.07	0.29 ± 0.05	0.51 ± 0.16	0.31 ± 0.06##	0.71 ± 0.17b\$	0.68 ± 0.05b
Glutaryl-CN (C5DC)	0.079 ± 0.014	0.059 ± 0.007	0.076 ± 0.010	0.046 ± 0.013	0.065 ± 0.025	0.075 ± 0.016	0.087 ± 0.017	0.053 ± 0.012
Hexanoyl-CN (C6)	0.17 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.01*	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.07
Octanoyl-CN (C8)	0.067 ± 0.011	0.081 ± 0.008	0.078 ± 0.008	0.075 ± 0.005	0.064 ± 0.014	0.060 ± 0.014	0.058 ± 0.015	0.056 ± 0.008
Decenoyl-CN (C10:1)	0.047 ± 0.010	0.064 ± 0.008	0.044 ± 0.006	0.049 ± 0.004	0.084 ± 0.016	0.047 ± 0.008	0.104 ± 0.028	0.068 ± 0.016
Cecanoyl-CN (C10)	0.054 ± 0.009	0.078 ± 0.009*	0.045 ± 0.010	0.058 ± 0.010	0.060 ± 0.008	0.052 ± 0.007#	0.076 ± 0.017	0.094 ± 0.019
Dodecanoyl-CN (C12)	0.73 ± 0.15	0.30 ± 0.04*	0.54 ± 0.10	0.41 ± 0.05	0.86 ± 0.27	0.46 ± 0.07#	1.10 ± 0.15b\$\$\$	1.06 ± 0.18b
Adipyl-CN (C6DC)	0.23 ± 0.08	0.39 ± 0.18	0.13 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.21 ± 0.10	0.24 ± 0.15	0.40 ± 0.07b	0.27 ± 0.09b
Tetradecenoyl-CN (C14:1)	0.17 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.02
Tetradecanoyl-CN (C14)	0.20 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.32 ± 0.07	0.24 ± 0.04
3-OH-tetradecanoyl-CN (C14OH)	0.028 ± 0.010	0.043 ± 0.004	0.047 ± 0.016	0.030 ± 0.020	0.050 ± 0.008	0.022 ± 0.005b*	0.077 ± 0.020\$	0.072 ± 0.038\$
Palmitoyl-CN (C16)	0.29 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.29 ± 0.04
3-OH-Hexadecenoyl-CN (C16:1OH)	0.051 ± 0.010	0.0363 ± 0.007	0.033 ± 0.008	0.029 ± 0.007	0.034 ± 0.004	0.031 ± 0.005##	0.024 ± 0.005##	0.063 ± 0.006b**
3-OH-Hexadecanoyl-CN (C16OH)	0.030 ± 0.007	0.013 ± 0.005	0.023 ± 0.007	0.018 ± 0.005	0.022 ± 0.004	0.032 ± 0.006b	0.076 ± 0.020b*	0.072 ± 0.038b*
Oleyl-CN (C18:1)	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.23 ± 0.07
Stearoyl-CN (C18)	0.088 ± 0.012	0.079 ± 0.009	0.120 ± 0.008\$\$\$	0.069 ± 0.008	0.1287 ± 0.008b	0.096 ± 0.010*	0.190 ± 0.027b***\$	0.160 ± 0.030b
3-OH-Oleyl-CN (C18:1OH)	0.042 ± 0.013	0.024 ± 0.007	0.028 ± 0.010	0.033 ± 0.005	0.039 ± 0.009	0.028 ± 0.003	0.039 ± 0.012	0.030 ± 0.010
3-OH-Stearoyl-CN (C18OH)	0.025 ± 0.003	0.025 ± 0.005	0.020 ± 0.007	0.019 ± 0.005	0.022 ± 0.008	0.019 ± 0.003	0.044 ± 0.012	0.044 ± 0.004b\$

Total carnitine= total acylcarnitine + free carnitine_ Total acylcarnitine= $\sum$ acylcarnitines_ CN: Carnitine

Values are means ± SEM *, ** vs CC, p<0.05 or p<0.01 respectively for one type of diet_ \$, \$\$ vs RC, p<0.05 or p<0.01 respectively for one type of diet_ #, ## vs CR, p<0.05 or p<0.01 for type of diet. Means labelled with a “b” are significantly different at 5% for one group of rats between a chow diet or a Western diet.

Table 3. List of plasma metabolites identified by the HPLC-HRMS based metabolomic phenotyping approach, ordered by metabolic pathway and discriminating 234-day-old CC, RC, RR and CR rats fed a chow diet or a Western diet

Metabolites (abundance unit) n=5-7	CC	RC	RR	CR	CCWD	RCWD	RRWD	CRWD
Ketogenic amino acids (leucine + lysine)								
Lysine ^{c, d} (10 ⁶)	18.5 ± 0.31	19.6 ± 2.18	16.7 ± 1.60	17.0 ± 1.21	19.1 ± 0.89	22.9 ± 1.85	19.3 ± 1.58	22.2 ± 2.52
Ketogenic and gluconeogenic amino acid								
ΔLeucine/Isoleucine ^{c, d} (10 ⁸)	33.4 ± 2.44	22.6 ± 3.82*	27.1 ± 3.39	30.0 ± 2.31	30.5 ± 2.79	26.7 ± 2.50	30.4 ± 2.90	27.1 ± 3.25
Phenylalanine ^{c, d} (10 ⁸)	13.4 ± 0.90	10.0 ± 0.17	11.9 ± 0.14	13.2 ± 0.80	13.7 ± 0.97	11.9 ± 0.66	13.9 ± 1.11	11.3 ± 1.53
Threonine ^{c, d} (10 ⁵)	24.0 ± 0.94	35.6 ± 9.01	33.0 ± 8.34	24.9 ± 5.47	40.7 ± 17.5	30.1 ± 3.99	50.7 ± 23.8	22.3 ± 3.75
Tryptophan ^{c, d} (10 ⁷)	11.3 ± 0.16	6.25 ± 1.20*	9.24 ± 1.74	9.40 ± 1.41	10.1 ± 2.60	9.00 ± 1.39	11.0 ± 1.48	7.23 ± 1.18
Tyrosine ^{c, d} (10 ⁷)	27.5 ± 0.11	18.9 ± 0.24*	22.3 ± 0.21	22.7 ± 0.21*	18.2 ± 0.01b	19.2 ± 0.01	18.1 ± 0.01	19.2 ± 0.02
Gluconeogenic amino acids								
Alanine ^{c, d} (10 ⁵)	85.1 ± 4.72	77.2 ± 8.02	78.7 ± 7.33	83.3 ± 6.88	62.1 ± 8.08	67.6 ± 5.72	57.2 ± 7.93	65.9 ± 6.63
Aspartate ^{c, d} (10 ⁵)	23.1 ± 1.47	22.8 ± 3.07	25.0 ± 1.47	27.0 ± 5.45	20.4 ± 2.10	18.0 ± 1.80	22.5 ± 2.41	20.3 ± 2.46
Asparagine ^{c, d} (10 ⁶)	74.6 ± 5.89	58.0 ± 7.91	75.7 ± 8.28	87.1 ± 12.1	79.1 ± 6.46	38.8 ± 5.43b***	67.9 ± 9.08\$	68.6 ± 6.31\$
Aspartate/asparagine ^{c, d} (10 ⁶)	76.9 ± 5.99	60.2 ± 7.90	78.2 ± 8.23	89.8 ± 12.4	81.1 ± 6.51	40.6 ± 5.37b***	70.2 ± 9.17\$	70.7 ± 6.14\$\$
Glutamate ^{c, d} (10 ⁵)	45.8 ± 5.71	31.4 ± 1.83	39.0 ± 4.38	43.7 ± 5.49\$	47.2 ± 7.23	27.6 ± 3.73*	38.2 ± 8.37	29.6 ± 2.49b*
Glutamine ^{c, d} (10 ⁵)	80.7 ± 7.29	71.8 ± 9.30	79.5 ± 12.6	76.3 ± 10.3	83.2 ± 16.9	99.6 ± 17.0	83.1 ± 11.9	77.0 ± 12.2
Glx ^{c, d} (10 ⁶)	12.6 ± 1.07	10.3 ± 0.93	11.8 ± 1.24	12.0 ± 1.48	13.0 ± 2.13	12.7 ± 1.97	12.1 ± 1.88	10.9 ± 1.37
Glycine ^{c, d} (10 ⁵)	15.9 ± 1.53	11.5 ± 2.35	14.5 ± 1.36	15.2 ± 0.89	16.4 ± 1.26	9.93 ± 1.77*	14.7 ± 2.85	15.9 ± 1.62\$
Histidine ^{c, d} (10 ⁵)	9.46 ± 1.11	12.9 ± 2.24	10.1 ± 2.26	9.33 ± 1.65	7.13 ± 1.57	8.67 ± 1.51	7.76 ± 0.77	8.21 ± 1.03
Methionine ^{c, d} (10 ⁷)	17.0 ± 0.64	14.0 ± 2.18	16.0 ± 1.49	15.7 ± 1.40	13.4 ± 1.30	14.3 ± 0.94	15.0 ± 1.29	13.4 ± 1.28
Proline ^{c, d} (10 ⁵)	42.9 ± 5.20	33.9 ± 5.76	41.7 ± 8.47	47.9 ± 8.39	39.9 ± 11.1	36.4 ± 8.09	35.2 ± 9.74	26.2 ± 5.00
Serine ^{c, d} (10 ⁶)	97.7 ± 6.41	71.1 ± 5.30*	80.4 ± 7.31	75.7 ± 8.13	118.0 ± 8.52b	101.0 ± 6.18b*	108.7 ± 11.8b	103.2 ± 9.88b
Valine ^{c, d} (10 ⁷)	30.4 ± 1.56	23.1 ± 2.07*	27.5 ± 2.44	30.7 ± 2.04	31.3 ± 2.90	28.4 ± 3.26	25.1 ± 2.71	29.2 ± 2.21
TCA cycle intermediates								
Pyruvate ^{c, d} (10 ⁷)	3.43 ± 0.34	3.00 ± 0.49	3.12 ± 0.75	2.79 ± 0.50	3.25 ± 0.74	3.64 ± 0.50	2.61 ± 0.48	2.74 ± 0.53
Succinate ^{c, d} (10 ⁷)	1.72 ± 0.11	2.29 ± 0.25*	1.76 ± 0.17	1.73 ± 0.29	2.59 ± 0.36b	2.20 ± 0.23	2.36 ± 0.16b	2.65 ± 0.22b
Citrate ^{c, d} (10 ⁷)	9.69 ± 0.62	9.50 ± 0.83	9.08 ± 1.19	9.49 ± 1.22	11.7 ± 2.24	13.4 ± 1.19b	9.79 ± 1.30\$	9.87 ± 0.91
Cis-aconitate ^{c, d} (10 ⁷)	12.6 ± 1.94	16.0 ± 4.74	12.5 ± 3.37	12.5 ± 2.72	10.4 ± 1.59	12.1 ± 2.07	10.9 ± 1.99	11.4 ± 2.14
Bile acids								
Taurine ^{c, d} (10 ⁶)	6.14 ± 0.28	5.21 ± 0.45	5.92 ± 0.41	5.91 ± 0.40	7.05 ± 0.65	4.87 ± 0.26**	6.07 ± 0.19\$\$	5.12 ± 0.40*
Cholic acid ^{c, d} (10 ⁵)	18.2 ± 8.41	23.5 ± 8.14	10.2 ± 5.27	6.92 ± 1.92	2.23 ± 2.05b	3.72 ± 1.86b	0.55 ± 0.30b	1.39 ± 0.66b
Glycocholic acid ^{c, d} (10 ⁵)	8.25 ± 2.53	8.49 ± 3.18	9.48 ± 4.96	4.92 ± 1.62	5.33 ± 4.95b	3.97 ± 1.75	2.49 ± 1.10	1.59 ± 0.71

Taurochloric acid ^{c,d} (10 ⁵)	4.51 ± 3.36	1.30 ± 0.51	4.45 ± 4.06	3.02 ± 1.63	0.19 ± 0.10	4.05 ± 2.70*	19.8 ± 17.3*	2.24 ± 0.62*
Glycoursodeoxycholic acid ^{c,d} (10 ⁶)	2.39 ± 0.38	1.98 ± 0.34	2.14 ± 0.46	2.23 ± 0.48	1.78 ± 0.29	1.68 ± 0.23	2.21 ± 0.41	2.06 ± 0.46
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) metabolism								
Nicotinic acid ^{c,d} (10 ⁷)	6.07 ± 0.28	5.11 ± 0.48	5.89 ± 0.42	5.92 ± 0.34	6.78 ± 0.54	5.11 ± 0.31*	6.16 ± 0.19\$	5.47 ± 0.32
Nicotinamide ^{c,d} (10 ⁷)	8.85 ± 1.29	6.63 ± 2.56	7.98 ± 1.35	9.03 ± 1.74	7.50 ± 1.59	5.06 ± 0.86	10.3 ± 3.07\$	7.88 ± 2.08
Creatinine metabolism								
Sarcosine ^{c,d} (10 ⁶)	8.51 ± 0.47	7.72 ± 0.80	7.87 ± 0.73	8.33 ± 0.69	6.21 ± 0.81	6.76 ± 0.57	5.72 ± 0.79	6.59 ± 0.66
Creatinine ^{c,d} (10 ⁶)	54.1 ± 4.36	37.7 ± 10.8	45.4 ± 8.59	38.0 ± 6.30*	44.9 ± 6.18	46.9 ± 4.21	53.5 ± 5.53	30.4 ± 6.76‡
Urea cycle								
Uric acid ^{c,d} (10 ⁷)	10.6 ± 1.41	5.51 ± 0.88*	8.93 ± 1.01	8.73 ± 0.75\$	9.96 ± 0.77	5.57 ± 0.71**	9.11 ± 1.07\$	8.91 ± 0.87\$
Arginine ^{c,d} (10 ⁵)	23.7 ± 7.59	18.3 ± 8.40	12.7 ± 1.68	13.2 ± 1.11	17.7 ± 2.77	17.2 ± 6.28	29.2 ± 7.05b	11.9 ± 2.05‡
Citrulline ^{c,d} (10 ⁵)	13.4 ± 2.04	14.2 ± 1.90	13.1 ± 2.12	10.7 ± 1.18	10.2 ± 1.16	11.6 ± 2.13	8.87 ± 1.28	8.39 ± 0.77
Ornithine ^{c,d} (10 ⁷)	26.1 ± 1.67	18.3 ± 3.59*	21.9 ± 2.81	23.6 ± 2.03	23.5 ± 2.39	21.3 ± 1.96	23.7 ± 2.43	21.3 ± 2.80
Microbiota fermentation								
Hippuric acid ^{c,d} (10 ⁶)	16.1 ± 3.99	23.2 ± 5.32	19.4 ± 2.62	14.5 ± 2.41	6.59 ± 0.81b	4.32 ± 0.75b	5.49 ± 0.94b	4.36 ± 0.30b*
2-hydroxyhippuric acid ^c (10 ⁵)	4.54 ± 1.56	3.30 ± 2.52	3.93 ± 1.53	4.35 ± 1.56	13.7 ± 4.01	3.96 ± 1.95*	12.1 ± 3.10b\$	7.77 ± 2.20
Nucleotides metabolism (Purines & Pyrimidines)								
5-hydroxy-indole-3-acetic acid ^{c,d} (10 ⁵)	7.27 ± 1.02	6.17 ± 1.24	7.68 ± 1.06	6.80 ± 0.94	8.81 ± 0.76	4.92 ± 0.93**	9.49 ± 1.17\$	7.73 ± 1.29
Myo-inositol ^c (10 ⁷)	12.3 ± 1.61	7.64 ± 0.50	9.93 ± 1.40	10.5 ± 1.23	12.3 ± 2.19	8.34 ± 1.56	9.91 ± 1.58	9.32 ± 0.90
Inosine ^{c,d} (10 ⁵)	6.89 ± 1.30	3.05 ± 1.18	5.24 ± 1.09	4.01 ± 0.53	6.73 ± 0.98	2.76 ± 0.79**	5.49 ± 1.34	6.68 ± 1.00\$
Hypoxanthine ^{c,d} (10 ⁶)	4.69 ± 0.76	1.39 ± 0.48**	4.11 ± 1.11	3.09 ± 0.46\$	3.88 ± 0.62	2.03 ± 0.63	3.54 ± 0.83	4.74 ± 0.95
Cytosine ^{c,d} (10 ⁷)	39.6 ± 1.48	32.8 ± 5.70	39.9 ± 4.40	36.7 ± 2.07	38.5 ± 2.67	39.7 ± 33.1	42.2 ± 2.63	36.2 ± 3.38
Adenine ^{c,d} (10 ⁷)	8.20 ± 0.58	7.03 ± 1.29	7.60 ± 1.16	7.82 ± 0.51	6.77 ± 0.49	7.14 ± 0.35	6.90 ± 0.41	5.58 ± 0.83b
Uracil ^{c,d} (10 ⁶)	4.55 ± 0.48	5.09 ± 0.62	4.12 ± 0.37	3.46 ± 0.35	4.46 ± 0.62	5.25 ± 0.81	5.07 ± 1.31	3.48 ± 0.45

ΔLeucine/isoleucine, inseparable with our method and leucine is only a ketogenic amino acid.

Values are means ± SEM.

*, ** vs CC, p<0.05 or p<0.01 respectively for one type of diet \$, \$\$vs RC, p<0.05 or p<0.01 respectively for one type of diet #, ## vs CR, p<0.05 or p<0.01 for type of diet Means labelled with a “b” are significantly different at 5% for one group of rats between chow and western diets.

^c Discriminant metabolites were putatively annotated (i.e. without chemical reference standards, based upon physicochemical properties and/or spectral similarity with public/commercial spectral libraries such as METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>) or HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)) and ^d definitively annotated with our home data base (i.e. based upon characteristic physicochemical properties of a chemical reference standards) (Courant, 2012).

CCWD had a decrease of SIRT1, FOXO1 and InsR2 expression as RRWD for GLUT2. Similarly to CRWD, RCWD presented increased ChREBP, PGC1 α and FOXO1 expression. The expression of genes involved in liver lipogenesis was decreased in CCWD (FASN, ACC1, FABP1). Only FASN was decreased in both IUGRWD rats. Concerning β -oxidation, CPT1a was increased in RRWD, Acacb in CRWD and HMGcl in RCWD, conjointly to transcriptional factors such as PPAR α in RCWD and Srebf1 in RCWD and CRWD.

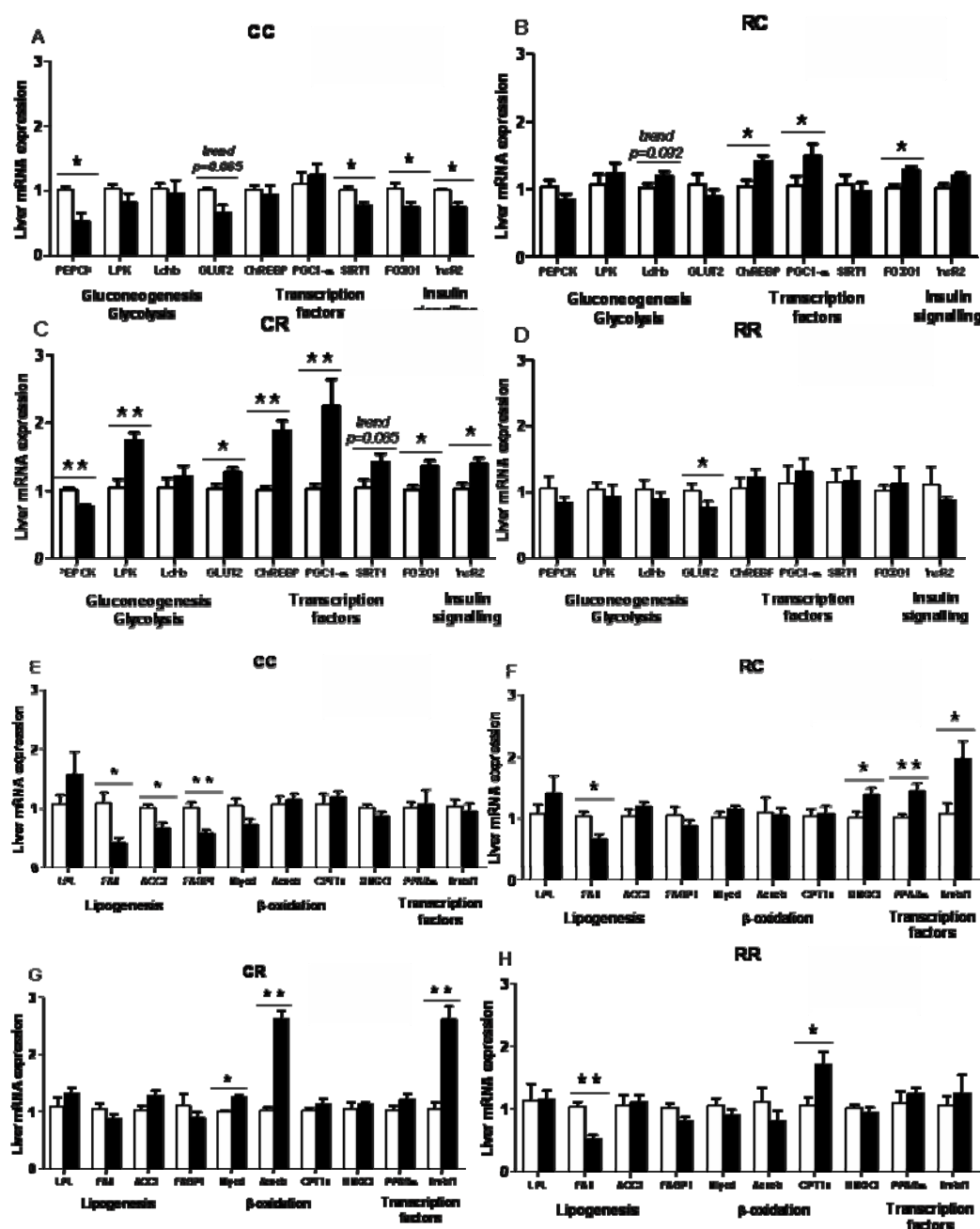


Figure 4. mRNA expression levels of hepatic genes regulating glucose and lipid metabolism and transcription factors from adult CC, RC, RR and CR rats of 234 days fed a chow (white bars) or a WD (black bars) diet.

*, **, *** chow diet vs Western diet, $p < 0.05$, $p < 0.01$ with $n = 6$ animals per group.

Discussion

Although there is growing evidence that adults born with IUGR have impaired insulin sensitivity, and therefore are at a higher risk of developing T2DM (24; 25), very little is known about the mechanisms associated with the progressive loss of IS. To the best of our knowledge, this is the first study describing the time course of metabolic alterations associated with insulin secretory capacity and insulin sensitivity depending on the time-window of perinatal protein restriction and the ingestion of a WD in adulthood. The data were obtained by a combination of integrative and targeted approaches on adult rats before they ever developed diabetes. Altogether our data suggest that (i) impaired insulin secretion appears to be one of the first alterations in young rats born IUGR, (ii) individuals born with IUGR and who experience catch up growth have impaired fasting substrate switch and alterations in energy storage, (iii) IUGR rats with a slow postnatal growth exposed to WD develop mitochondrial β -oxidation dysfunction with fat accretion; and (iv) a slow postnatal growth rate in the absence of IUGR prevents increased fat accretion and IS loss with specific hepatic adaptations despite the subsequent WD-exposure. Therefore maternal protein restriction during either gestation or lactation or both periods does not lead to the same changes in insulin sensitivity or metabolic alterations in adulthood.

Impaired insulin secretion, fat storage and fuel oxidation switch in IUGR caught-up rats

The enhanced insulin sensitivity observed in the current study in young adult rats born IUGR is consistent with previous reports (25-27). However, we found this did not ever differ when measured at a later age between RC and CC rats, regardless of diet. On the other hand, HOMA- β index decreased in RC group, suggesting pancreatic β -cell functional failure. WD-exposure may worsen β -cell injury since a lower HOMA- β was observed in RCWD as well as CCWD groups, compared with the chow-fed animals. This was associated in RCWD rats with low levels of nicotinic acid, a vitamin known to up-regulate insulin secretion (28). Additionally circulating NEFA were higher during the clamp, which may reflect higher rates of lipolysis due to the loss of the anti-lipolytic insulin action in adipose tissue. The accelerating effect of WD on the occurrence of insulin resistance is supported by a significant fat accretion in IUGRWD rats, along with high circulating NEFA, thought to be associated with glucose intolerance (29) and diabetes (30) through impaired insulin signal transduction (31) and lipotoxicity (4). These results suggest that whereas a prenatal nutritional insult could have lasting effects on β -cell function and adipose tissue insulin sensitivity, accelerated postnatal growth may constitute a 'second hit' that worsens the initial insult.

Moreover, under chow-fed conditions, mild hyperglycaemia, lower circulating gluconeogenic amino acid and lactate concentrations suggest higher gluconeogenesis in RC compared to CC rats. This feature is sustained under WD as lactate concentrations were lower, concomitant with a trend towards higher liver expression of LDHb, involved in lactate-pyruvate conversion, and higher transcripts of ChREBP, PGC1 α and FOXO1, known to up-regulate hepatic glucose production (32; 33). Whereas CCWD and CRWD had decreased PEPCK transcript, no change was apparent in RCWD at this age but PEPCK activity was found to be increased in 11-month-old IUGR rats in other studies (34). Epigenetic silencing of gluconeogenic down-regulators may be involved, as proposed in recent studies in caught-up IUGR rats (35).

Additionally, RCWD rats had higher plasma free carnitine/C18-carnitine ratio than CCWD and RRWD, and higher citrate levels than their chow-fed counterparts. This suggests lesser rates of fatty acid oxidation in RCWD. Excess citrate indeed is converted to malonyl-CoA which inhibits CPT1a, a limiting enzyme for the entry of NEFA into mitochondrion, and consequently, hepatic β -oxidation (36), and ketogenesis (37). Such TCA intermediate accumulation in RCWD could result from lower TCA activity, supported by the high plasma C2-carnitine/free carnitine ratio, and the lack of elevation in succinate, as observed in the other three WD-groups. Fasting and high-energy intake have long been known to elicit a switch from glucose oxidation to fat utilization as a preferred fuel (38). However, lower plasma ketone bodies were observed in RCWD, compared to CCWD, likely due to a lower rate of TCA cycle activity and/or β -oxidation. Indeed, high NEFA levels, hyperketonemia and higher hepatic transcript of PPAR α , that targets β -oxidative and glucose-sparing enzymes, and HMGCl (the last enzyme involved in ketone body production) observed in RCWD compared to RC, reflect the ability of caught-up IUGR rats to produce ketones. A higher proportion of NEFA could be diverted from ketogenesis towards lipogenesis. This appeared negligible despite higher expression of the transcription factor Srebf1, a controller of lipogenic gene expression (39) whose effect could be counteracted by low FASN. Unchanged liver triglyceride content and hepatic expression of ACC1, the rate-limiting step in triglyceride synthesis, support this. Regarding bile acids, RCWD had lower circulating glycine and taurine levels associated with higher taurochloric acid compared with CCWD. This discrepancy may reflect an early deregulation in glucose/lipid homeostasis as bile acids are involved in lipid clearance and glucose/lipid metabolism (40). In agreement with our findings, alterations in bile acid pool (41) and lower glycine levels (42), were recently identified in diabetic humans.

Glycine was proposed as a pre-diabetes-specific marker in a human metabolomic study (42) and confirmed in the EPIC-cohort (43).

Pre- and postnatal maternal protein restriction could increase incomplete β -oxidation

The embryonic phase is crucial for pancreas development, β -cell differentiation, and maturation (44). Impaired β -cell insulin secretory capacity therefore appears to be an early phenomenon in IUGR, leading to an increased susceptibility to develop T2DM later in life. The lower HOMA- β observed here in adult IUGR rats compared to CC support this. Besides, the response to Western diet was similar in RR and RC rats in terms of fat accretion. Mechanisms involved in these two groups of rats could differ according to metabolic fingerprint and liver gene pattern. For instance, the enhanced insulin sensitivity, which persisted only in RR rats (25; 27) could be due to the smaller size of adipocytes, as observed in our previous study (45). Small adipocytes indeed are more insulin sensitive than large ones (46). Nevertheless, in other studies, IUGR offspring nursed by protein-restricted mothers had impaired glucose tolerance by 15 months of age (24), and developed frank diabetes at 17 months (25) with a transiently enhanced glucose tolerance and whole-body insulin sensitivity (25; 26) in young adulthood as observed in our study. WD-exposure revealed mitochondrial dysfunctions: this finding illustrates how a preserved metabolic pattern during early life may lead to impaired metabolic outcomes at a later stage. Indeed the absence of decreased plasma total acylcarnitines and C2-carnitine in RRWD compared with other WD-rats reflect tissue-level accumulation of acyl-CoA and other CoA-bound carboxylic acids that could contribute to β -cell failure in this group (47). Evidence for increased β -oxidation in RRWD includes the unaltered liver triglyceride content, increased hepatic CPT1a expression, higher plasma levels of malonyl-CoA byproduct, and methylmalonyl-carnitine (a precursor of succinyl-CoA), and a 2-fold increase in plasma arginine levels, an amino acid thought to regulate multiple pathways involved in β -oxidation (48). Furthermore, the accumulation of free carnitine, and of short-, medium-, and long-chain acylcarnitines in RRWD rats, as compared with CCWD, and the lower free-carnitine/C18-carnitine ratio observed in RRWD than in RCWD, suggest β -oxidation was enhanced but incomplete in RRWD. These findings are consistent with the mitochondrial overload concept recently proposed (49) to contribute to impaired insulin signalling and therefore IR through acylcarnitines-mediating protein acetylation/acylation (49).

Low-postnatal growth preserves energy homeostasis and insulin sensitivity

To the best of our knowledge, the peculiar metabolic response of CR rats to Western diet observed in the current study has never been described before. CRWD rats showed improved insulin sensitivity as well as increased insulin secretory capacity, along with lesser fat accretion despite a hyperphagia driven by impaired satiety-control as described in our previous study (12). The improved HOMA- β in CRWD rats could result from higher nutrient-stimulation of β -cells (50) as postnatal protein restriction programs low parasympathetic-nervous system activity associated with weak cholinergic-insulin trophic effect and low β -cell stimulation (51). The effects of insulin and nutrients on fat accretion could be counteracted in CRWD by increased energy expenditure due to leptin-induced thermogenesis (52). This hypothesis is in agreement with the central leptin hypersensitivity (53) and the elevated thyroid function (54) described in offspring suckled by mothers fed a protein-restricted diet. Here higher succinate levels, lower C2-carnitine/free carnitine ratio and plasma triglyceride levels, along with higher medium- and long-chain acylcarnitines and lower odd-chain-carnitine support higher whole-body β -oxidation in CRWD than CR rats.

Additionally, compared with the other groups, liver adapted differently to Western diet in CRWD group with changes that may reflect higher glucose uptake (increased GLUT2 transcript) and glycolytic activity (increased LPK) associated with lower gluconeogenesis (increased SIRT1) and β -oxidation (increased Acacb, limiting β -oxidation enzyme). This hypothesis is supported by the recent demonstration that SIRT1, a nutrient sensor, suppresses hepatic gluconeogenesis in long-term fasting whereas it enhances gluconeogenesis in short-term fasting (55). Taken together, this mechanism could confer CR rats a higher metabolic flexibility to cope with a nutritionally deleterious environment.

In conclusion metabolomic signatures and targeted approaches shed more light on the time-course of the metabolic alterations that characterize the long-term consequences of a perinatal nutritional insult.

Acknowledgments

A. Martin Agnoux was the recipient of a doctoral fellowship from PONAN (Pôle Nantais Alimentation et Nutrition).

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

A.M.A. and M.C.A-G. wrote the first draft of the manuscript. A.M.A., J.P.A., G.S., P.P., D.D., and M.C.A-G. contributed to the editing of the manuscript. A.M.A. provided the original artwork. A.M.A. and G.P. contributed to the animal care and the hyperinsulinemic-euglycemic clamp. A.M.A. and M.C.A-G. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

The authors thank Muhammad-Quaid Zaman and Véronique Leray (Food Science and Engineering, Nutrition and Endocrinology, LUNAM Université, Oniris, Nantes, France) for their expertise in hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique. The authors also acknowledge Frédérique Courant and Anne-Lise Royer (LABERCA, Oniris, Nantes, France) for standard characterization in LCMS method.

References

1. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet Med* 2007; 4:451-463.
2. Ridderstrale M, Groop L: Genetic dissection of type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:10-17.
3. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD: Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019-1022.
4. Unger RH: Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 2002;53:319-336.
5. Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayoa PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW: 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* 2006;571:221-230.
6. Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, Zhao L, Wong SW, Minkler PE, Hwang DH, Newman JW, Garvey WT: Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *J Nutr* 2009;139:1073-1081.
7. Storlien L, Oakes ND, Kelley DE: Metabolic flexibility. *Proc Nutr Soc* 2004;63:363-368.
8. Alexandre-Gouabau MC, Courant F, Le Gall G, Moyon T, Darmaun D, Parnet P, Coupe B, Antignac JP: Offspring metabolomic response to maternal protein restriction in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR). *J Proteome Res* 2011;10:3292-3302.
9. Orozco-Solis R, Matos RJ, Lopes de Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhaes de Castro R, Bolanos-Jimenez F: Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:990-1000.
10. Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ: Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 1990;57:107-118.
11. Coupe B, Grit I, Darmaun D, Parnet P: 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* 2009;297:R813-824.
12. Martin Agnoux A, Alexandre-Gouabau MC, Le Dréan G, Antignac JP, Parnet P: Relative contribution of fetal and postnatal nutritional periods on feeding regulation in adult rats. *Acta Physiologica* 2013;in revision.
13. Bain JR, Stevens RD, Wenner BR, Ilkayeva O, Muoio DM, Newgard CB: Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge. *Diabetes* 2009;58:2429-2443.
14. Kobayashi M, Ikegami H, Fujisawa T, Nojima K, Kawabata Y, Noso S, Babaya N, Itoi-Babaya M, Yamaji K, Hiromine Y, Shibata M, Ogihara T: Prevention and treatment of obesity, insulin resistance, and diabetes by bile acid-binding resin. *Diabetes* 2007;56:239-247.
15. Schooneman MG, Vaz FM, Houten SM, Soeters MR: Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes* 2013;62:1-8.
16. Rueda-Clausen CF, Dolinsky VW, Morton JS, Proctor SD, Dyck JR, Davidge ST: Hypoxia-induced intrauterine growth restriction increases the susceptibility of rats to high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes* 2011;60:507-516.
17. Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, Llabre MM, Kumar M, Czarnecki EM, Schneiderman N, Skyler JS, Marks JB: Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;47:177-184.
18. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:E214-223.

19. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K: A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:2461-2474.
20. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
21. Mingorance C, Duluc L, Chalopin M, Simard G, Ducluzeau PH, Herrera MD, Alvarez de Sotomayor M, Andriantsitohaina R: Propionyl-L-carnitine corrects metabolic and cardiovascular alterations in diet-induced obese mice and improves liver respiratory chain activity. *PLoS One* 2012;7:e34268.
22. Courant F, Pinel G, Bichon E, Monteau F, Antignac JP, Le Bizec B: Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst* 2009;134:1637-1646.
23. Courant F, Royer AL, Chereau S, Morvan ML, Monteau F, Antignac JP, Le Bizec B: Implementation of a semi-automated strategy for the annotation of metabolomic fingerprints generated by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry from biological samples. *Analyst* 2012;137:4958-4967.
24. Hales CN, Desai M, Ozanne SE, Crowther NJ: Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans* 1996;24:341-350.
25. Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales CN: Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2001;2:139-143.
26. Langley SC, Browne RF, Jackson AA: Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* 1994;109:223-229.
27. Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD: Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol* 1996;271:E1128-1134.
28. Belenky P, Bogan KL, Brenner C: NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* 2007;32:12-19.
29. Stefan N, Stumvoll M, Bogardus C, Tataranni PA: Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E1156-1161.
30. Boden G, Chen X: Effects of fatty acids and ketone bodies on basal insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:577-583.
31. White MF: IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E413-422.
32. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M: CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 2001;413:179-183.
33. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM: Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003;423:550-555.
34. Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN: Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr* 1996;76:591-603.
35. Vo TX, Revesz A, Sohi G, Ma N, Hardy DB: Maternal protein restriction leads to enhanced hepatic gluconeogenic gene expression in adult male rat offspring due to impaired expression of the liver X receptor. *J Endocrinol* 2013;218:85-97.
36. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA: Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S138-143.
37. Drynan L, Quant PA, Zammit VA: Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over beta-oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle

- activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states. *Biochem J* 1996;317 (Pt 3):791-795.
38. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA: The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963 ;1:785-789.
 39. Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL: Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13656-13661.
 40. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B: Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009;89:147-191.
 41. Salek RM, Maguire ML, Bentley E, Rubtsov DV, Hough T, Cheeseman M, Nunez D, Sweatman BC, Haselden JN, Cox RD, Connor SC, Griffin JL: A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol Genomics* 2007;29:99-108.
 42. Wang-Sattler R, Yu Z, Herder C, Messias AC, Floegel A, He Y, Heim K, Campillos M, Holzapfel C, Thorand B, Grallert H, Xu T, Bader E, Huth C, Mittelstrass K, Doring A, Meisinger C, Gieger C, Prehn C, Roemisch-Margl W, Carstensen M, Xie L, Yamanaka-Okumura H, Xing G, Ceglarek U, Thiery J, Giani G, Lickert H, Lin X, Li Y, Boeing H, Joost HG, de Angelis MH, Rathmann W, Suhre K, Prokisch H, Peters A, Meitinger T, Roden M, Wichmann HE, Pischon T, Adamski J, Illig T: Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Mol Syst Biol* 2012;8:615.
 43. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Muhlenbruch K, Drohan D, Joost HG, Fritsche A, Haring HU, Hrabe de Angelis M, Peters A, Roden M, Prehn C, Wang-Sattler R, Illig T, Schulze MB, Adamski J, Boeing H, Pischon T: Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 2013;62:639-648.
 44. Theys N, Ahn MT, Bouckennooghe T, Reusens B, Remacle C: Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *J Nutr Biochem* 2011;22:985-994.
 45. Coupe B, Grit I, Hulin P, Randuineau G, Parnet P: Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. *PLoS One* 2012;7:e30616.
 46. Crandall DL, Fried SK, Francendese AA, Nickel M, DiGirolamo M: Lactate release from isolated rat adipocytes: influence of cell size, glucose concentration, insulin and epinephrine. *Horm Metab Res* 1983;15:326-329.
 47. Unger RH: Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995;44:863-870.
 48. Tan B, Li X, Yin Y, Wu Z, Liu C, Tekwe CD, Wu G: Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. *Front Biosci* 2012;17:2237-2246.
 49. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM: Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:45-56.
 50. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Masse F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V, Prentki M: A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 2004;53:1007-1019.
 51. Lesage J, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, Vieau D: Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006;9:183-198.
 52. Nonogaki K: New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 2000;43:533-549.

53. Stocker CJ, Wargent ET, Martin-Gronert MS, Cripps RL, O'Dowd JF, Zaibi MS, Cottrell EC, Mercer JG, Duncan JS, Cawthorne MA, Ozanne SE, Arch JR: Leanness in postnatally nutritionally programmed rats is associated with increased sensitivity to leptin and a melanocortin receptor agonist and decreased sensitivity to neuropeptide Y. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:1040-1046.
54. Passos MC, da Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouco T, de Moura EG: Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res* 2002 ;34:40-43.
55. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, Milne J, Meyers DJ, Cole P, Yates J, 3rd, Olefsky J, Guarente L, Montminy M: A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 2008;456:269-273.
56. Tran TT, Kahn CR: Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2010;6:195-213.

Supplementary data

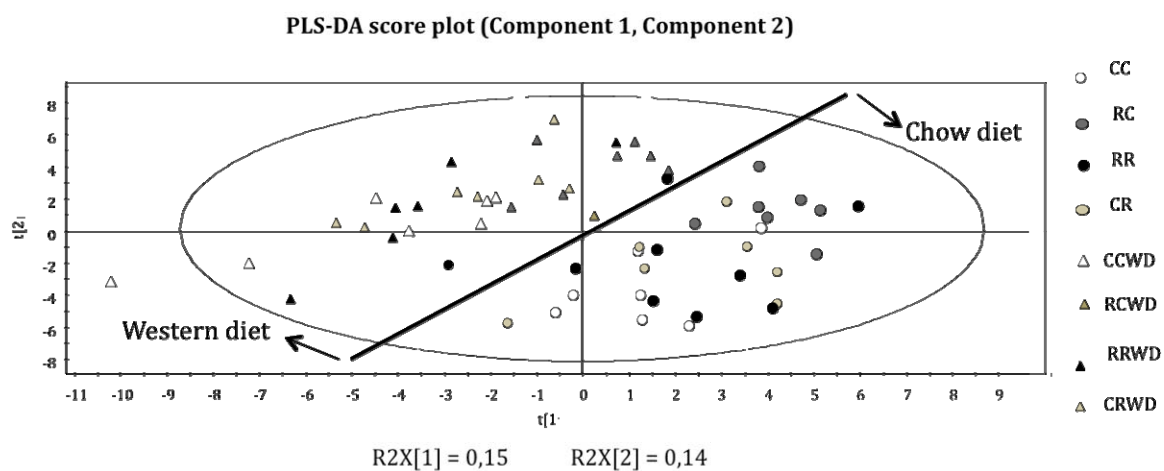


Figure S1. PLS-DA analysis of fasting plasma metabolome at D234 in CC, RC, RR and CR rats fed a chow diet or a Western diet. Each LC-HRMS profile was constituted by 2032 MS signals after positive electrospray ionisation.

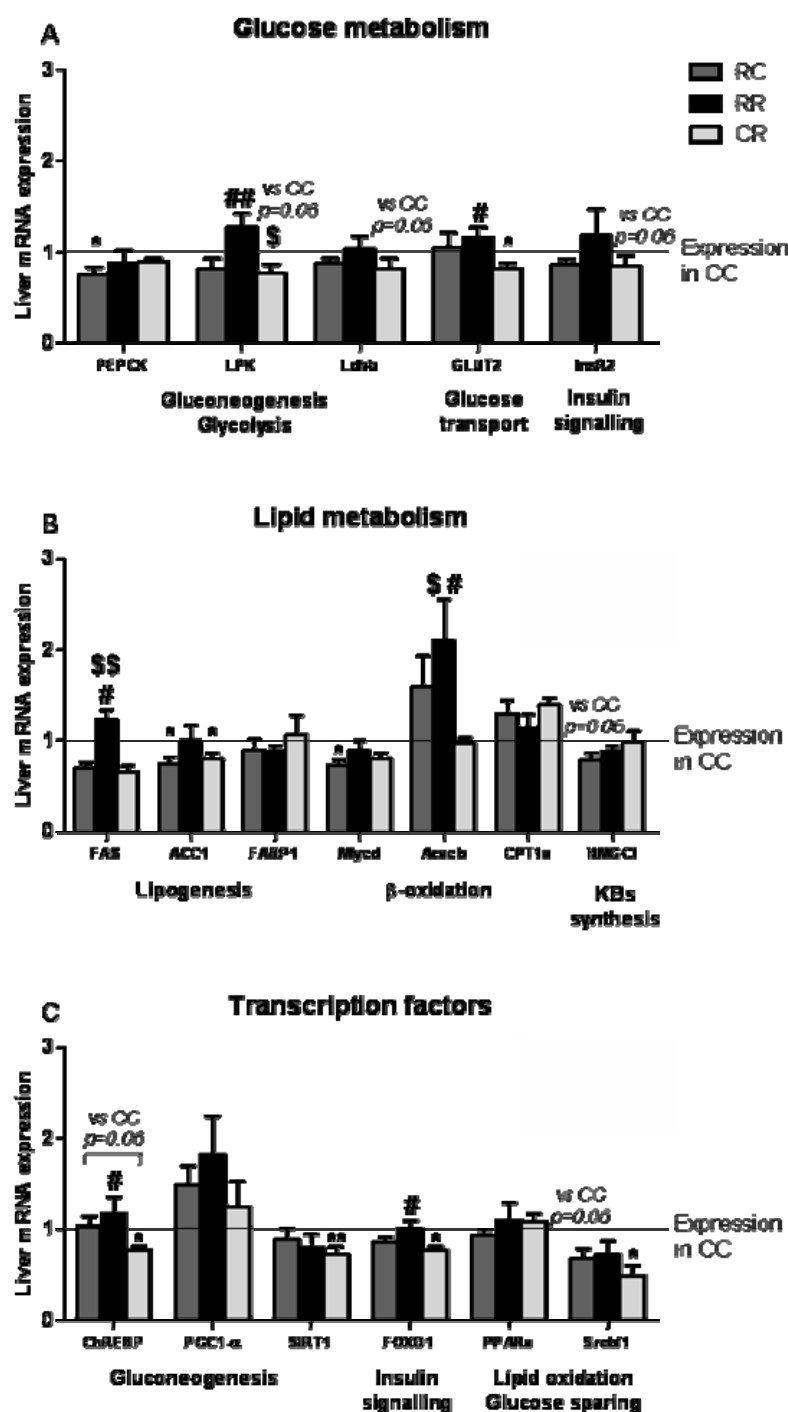


Figure S2. mRNA expression levels of hepatic genes regulating glucose and lipid metabolism and transcription factors from adult CC, RC, RR and CR rats of 234 days fed a chow diet. Gene expression in the CC group is set as 1.

*, ** vs CC, $p < 0.05$ and 0.01 respectively; \$, \$\$ vs RC, $p < 0.05$ and 0.01 respectively; #, ## vs CR, $p < 0.05$ and 0.01 respectively with $n = 6$ animals per groups.

Table S2. List of metabolites identified in adult CC, RC, RR and CR rats fed a chow diet or a Western diet and shown in Table 2

Metabolites	RT	Monoisotopic mass (m/z)	[M+H] ⁺ or [M-H] ⁻ calculated mass m/z	Mean [M+H] ⁺ or [M-H] ⁻ detected mass m/z	Mean error in accurate mass (ppm)	Fragments Or adducts
Ketogenic amino acids (leucine + lysine)						
Lysine	0.80	146.1055	147.1128	147.1128	0.05	169.0947 [M+Na] ⁺
Ketogenic and gluconeogenic amino acids						
Leucine/Isoleucine	1.28	131.1094	132.1019	132.1018	-1.36	154.0837 [M+Na] ⁺ 263.1962 [2M+H] ⁺
Phenylalanine	1.78	165.0789	166.0863	166.0862	0	
Threonine	0.72	119.0582	118.0510	118.0509	-0.84	
Tryptophan	3.39	204.0899	205.0971	205.0971	-0.14	227.0790 [M+Na] ⁺
Tyrosine	0.95	181.0739	182.0812	182.0811	0.05	204.0630 [M+Na] ⁺
Gluconeogenic amino acids						
Alanine	0.71	89.0477	90.0550	90.0548	2.22	
Aspartate	0.64	133.0375	132.0302	132.0301	-0.76	
Asparagine	1.33	132.0535	131.0462	131.0352	84	
Glutamate	0.65	147.05316	146.0459	146.0457	1.37	
Glutamine	0.71	146.0691	145.0619	145.0626	-4.82	
Glycine	0.96	75.0320	74.0248	74.0323	-101	
Histidine	0.76	155.06948	154.0622	154.0619	0.13	
Methionine	0.92	149.0510	150.0583	150.0583	-0.86	172.0402 [M+Na] ⁺ 299.1092 [2M+H] ⁺
Proline	0.78	115.0633	116.0706	116.0706	0.17	138.0550 [M+Na] ⁺
Serine	1.08	105.0420	104.0353	104.0432	-76	
Valine	0.8	117.0789	118.0863	118.0862	-0.36	140.0705 [M+Na] ⁺ 101.0755 [M-NH ₃ +H] ⁺ 235.0924 [2M+H] ⁺
TCA cycle intermediates						
Pyruvate	0.75	88.01604	87.0088	87.0090	2.29	
Succinate	1.00	118.02661	117.0193	117.0190	2.56	
Citrate	0.98	192.02700	191.0197	191.0195	1.05	

Cis-aconitate	0.83	174.01644	173.0092	173.0090	1.16	
Bile acids						
Taurine	0.58	125.0146	126.0219	126.0228	-0.16	148.0329 [M+Na]+ 143.0359 [M+NH4]+ 251.0437 [2M+H]+ 467.3014 [M+CH3COO]-
Cholic acid	11.66	408.28757	407.2803	407.2803	0	
Glycocholic acid	10.75	465.3090	464.3017	464.3017	0	
Taurochloric acid	8.58	515.29167	514.2844	514.2837	1.36	
Glycodeoxycholic acid	16.16	449.31357	450.3209	450.3212	-0.66	899.6344 [2M+H]+
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) metabolism						
Nicotinic acid	0.58	123.03203	124.0390	124.0411	16.93	146.0212[M+Na]+
Nicotinamide	1.15		123.0553	123.0553	0	145.0372 [M+Na]+ 155.0815 [M+CH3OH+H]
Creatinine metabolism						
Sarcosine	0.83	89.04768	90.0550	90.0547	-3.33	112.0369 [M+Na]+
Creatinine	0.77	113.05892	114.0662	114.0656	5.17	136.04869 [M+Na]+
Urea cycle						
Uric acid	1.12	168.0283	169.0356	169.0356	-0.06	
Arginine	1.36	174.0159	175.1189	175.1189	-0.11	197.0917 [M+Na]+
Citrulline	1.04	175.0957	176.1030	176.10299	0	198.0849 [M+Na]+ 159.0764 [M-NH3+H]+
Ornithine	1.04	132.0899	133.0971	133.0972	0.07	155.0791[M+Na]+
Microbiota fermentation						
Hippuric acid	5.74	179.0582	178.0510	178.0551	1.12	
2-hydroxyhippuric acid	1.28	195.0537	194.0464	194.0491	13.91	
Nucleotides metabolism (Purines &Pyrimidines)						
5-hydroxy-indole-3-acetic acid	3.83	191.05824	190.0510	190.0542	16.84	
Myo-inositol	0.63	180.0634	181.0707	203.0526(Na)	-32	
Inosine	1.04	268.08078	269.08805	268.9981	33	291.07055 [M+Na]+
Hypoxanthine	1.18	136.0385	137.0458	137.0457	0.73	273.10818
Cytosine	0.88	111.0433	112.0505	112.05063	0.74	134.0325[M+Na]+ 223.0938[2M+H]+
Adenine	0.76	135.0545	136.0618	136.0576	30.8	
Uracil	1.19	112.0273	113.0345	113.0347	-1.77	135.0165 [M+Na]+ 130.0864 [M+NH4]+ 225.0866 [2M+H]+

RT: Retention time; m/z: mass to charge ratio_The metabolites were sorted by metabolic pathways involvement

Discussion et perspectives sur les conséquences de la programmation du comportement alimentaire et du métabolisme à long terme

Les données obtenues au cours de nos travaux présentés ci-dessus confirment qu'un RCIU (c.à.d. nos groupes d'animaux RR et RC) est associé à des modifications du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique. Toutefois, des effets plus délétères sont observés sur le métabolisme énergétique des individus ayant fait l'expérience d'une croissance postnatale rapide (groupe RC) en faveur d'une prédisposition à développer un SMet à l'âge adulte. Ces résultats apportent ainsi des éléments nouveaux quant aux mécanismes qui pourraient être impliqués dans les altérations métaboliques, notamment grâce à l'exposition chronique des différents groupes d'animaux à un régime hypercalorique qui aura permis de révéler des différences ténues ou latentes. De plus, par l'étude d'un groupe de rat nés de mères contrôle mais allaités par des mères restreintes en protéines (groupe CR), nos résultats apportent un éclairage supplémentaire sur l'importance de la fenêtre périnatale d'exposition à durant laquelle l'empreinte métabolique (c.à.d. gestation et/ou lactation).

1. Une programmation du comportement alimentaire propre aux trajectoires de croissance pré- et postnatale

Les résultats du premier volet de notre étude ont mis en évidence que le comportement alimentaire, en terme de préférences alimentaires, d'organisation des repas, ainsi que de réponse adaptative centrale en situation obésogène, pouvaient varier selon la fenêtre précoce de programmation métabolique. Ces modifications pourraient contribuer aux spécificités phénotypiques observées entre les différents groupes d'animaux étudiés.

Les preuves d'une altération entre les variations des concentrations en leptine en période néonatale (précisément entre 4 et 16 jours de vie chez le rat) et la mise en place des circuits neuronaux impliqués dans la prise alimentaire (Bouret et al, 2004 ; Coupé et al, 2009 ; Yura et al, 2005) d'une part, et le risque de développer une résistance à la leptine en cas de régime hypercalorique (Attig et al, 2008) d'autre part, existent dans la littérature. Pour autant, les mécanismes impliqués entre l'altération de ces circuits neuronaux et la mise en place d'une leptino-résistance à l'âge adulte ne sont pas clairement établis.

Bien qu'il n'existe aucunes données dans la littérature concernant précisément le pic de leptine en période néonatale chez des animaux CR, nos propres résultats ainsi que de récentes études (Cottrell et al, 2011; Stocker et al, 2012) suggèrent que la résistance à la

leptine serait davantage programmée en période prénatale plutôt qu'au cours de l'allaitement. Ces observations soulignent ainsi que le pic de leptine néonatal ne serait pas le seul déterminant de cette programmation. En réponse à la consommation d'un régime hypercalorique, les animaux issus des groupes RR et RC présentent des caractéristiques d'une leptino-résistance hypothalamique (Lin et al, 2000), non présentes chez les rats CC et CR. De plus, en situation obésogène, les animaux nés avec un RCIU présentent une augmentation de masse corporelle ainsi qu'une accrétion adipeuse bien plus importante que celles observées chez les animaux nés contrôle. Pour autant, ces modifications morphologiques ne sont pas accompagnées d'une hyperphagie plus importante par rapport aux animaux du groupe contrôle également soumis à un régime hypercalorique. Des mécanismes propres à la régulation de l'homéostasie énergétique (cf. section 2 ci-dessous), ou du métabolisme de façon générale, pourraient être davantage impliqués dans l'accrétion adipeuse de ces animaux (RR et RC), plaçant alors la résistance à la leptine à un second plan.

Le RCIU s'inscrirait-il dans le concept de chronobésité ?

Des études récentes proposent également que les pathologies métaboliques telles que l'obésité et le DT2M seraient associées à une désynchronisation chronique du cycle veille/sommeil, et des rythmes circadiens en général, ce qui favoriserait la surcharge lipidique. Ce nouveau concept montrant un lien entre le métabolisme lipidique et la régulation du rythme circadien est appelé chronobésité (Mendoza et al, 2008; Froy et al, 2011). De nombreuses fonctions physiologiques, biochimiques et hormonales, telles que la thermorégulation, la prise alimentaire ou encore les concentrations plasmatiques en hormone et de certains substrats énergétiques montrent des variations sur 24h qui dépendent de l'horloge centrale située dans le noyau suprachiasmatique (Ando et al, 2009).

Cependant, le tissu adipeux – ainsi que d'autres tissus périphériques – exprime la majorité des gènes de l'horloge, ce qui lui confère un rôle d'horloge secondaire (Schibler et al, 2003; Ando et al, 2005; Zvonic et al, 2006). L'expression de la leptine est donc soumise à des variations circadiennes (Schoeller et al, 1997) et les rythmes d'adipogenèse et de lipogenèse dépendent de l'horloge adipeuse (Fontaine et al, 2003; Shimba et al, 2005). Dans ce contexte, nos données pourraient indiquer une désynchronisation des rythmes au niveau adipeux chez les rats nés avec un RCIU mis en situation obésogène, ce qui favoriserait le développement de l'obésité. En effet, par rapport aux animaux contrôles, les animaux nés avec un RCIU, quelle que soit la vitesse de croissance postnatale, présentent une hyperphagie diurne ainsi qu'une accrétion adipeuse significativement supérieure à celle de leur propre

témoin recevant un régime de laboratoire. D'autre part, de nombreuses études expérimentales ont montré que le tissu adipeux des individus nés avec un RCIU était soumis à l'empreinte métabolique (Bieswal et al, 2006; Zhang et al, 2007; Bol et al, 2008; Bol et al, 2009). L'ensemble de ces éléments soutiendraient ainsi une désynchronisation potentielle des rythmes au niveau adipeux au regard de l'accrétion adipeuse (Bray & Young, 2007), cette hypothèse restant toutefois à démontrer. Une étude clinique sur le rythme circadien du tissu adipeux (prélevé par biopsie) d'adultes nés avec un RCIU permettrait par exemple de générer des données nécessaires à cette démonstration.

La physiologie de la programmation du comportement alimentaire par l'environnement nutritionnel périnatal présente ainsi encore de nombreuses perspectives de recherche qui devraient permettre de mieux caractériser sa contribution dans le risque de développer une obésité à l'âge adulte chez les individus nés avec un RCIU.

Une hypersensibilité ou une insensibilité lipidique du SNC programmée par une faible croissance postnatale en l'absence d'un RCIU ?

Le comportement face aux aliments palatable, c.à.d. riche en lipides et en carbohydrates, pourrait également être programmé dès le plus jeune âge et favoriser l'installation d'une obésité par leur surconsommation. Les résultats issus de modèles animaux sur une descendance née avec un RCIU et ayant fait ou non l'expérience d'un rattrapage de croissance précoce diffèrent selon les modèles, la souche utilisée, le type de test réalisé ou encore l'âge des animaux. De plus, il existerait sur ce sujet un dimorphisme sexuel à prendre en compte (Palou et al, 2010, Langley-Evans et al, 2005). Il est au final difficile d'établir des conclusions définitives au vu des résultats existants par rapport au développement de préférences alimentaires chez ces individus, mais aussi sur la spécificité d'une fenêtre de développement sur cet aspect. Nos propres résultats iraient davantage vers l'absence d'attraction vers les aliments riches en sucre ou en lipide, ce qui ne contribuerait donc pas à expliquer la prédisposition qu'on leur connaît à devenir obèse lorsque l'environnement nutritionnel est pléthorique.

Pour autant, nos travaux montrent clairement que notre groupe d'animaux ayant eu uniquement une trajectoire de croissance postnatale faible (CR) présentent une appétence plus importante pour les aliments de nature lipidique. Nous avons attribué cette surconsommation (observée au cours d'un test de préférence entre trois aliments – riche en lipides, en carbohydrates ou témoin – et en situation obésogène prolongée), à une diminution de la

satiété spécifique aux lipides du fait d'une altération de l'expression de l'entérostatine (Erlanson-Albertsson, 1997) et de récepteurs impliqués dans sa signalisation au niveau hypothalamique (Berger et al, 2004; Lin & York, 2005; Lin et al, 2007). Des altérations des systèmes motivationnels et de la récompense impliqués dans le « wanting » et le « liking » pourraient exister chez les animaux du groupe CR. En effet, l'ingestion d'une alimentation palatable, tend à augmenter la consommation alimentaire et donc à prolonger les repas (Fetissov et al, 2000) notamment par l'activation de la signalisation dopaminergique et opioïdérique, présents dans le système mésolimbique dit « système de la récompense » (Fulton, 2010; Berthoud, 2006). L'activation de ces voies métaboliques peut créer une sensation de plaisir qui interfère avec les signaux physiologiques de la satiété favorisant la surconsommation d'aliments palatables mais aussi par le développement de comportements similaires à ceux de l'addiction – passant par la désensibilisation du système de la récompense – lorsque l'exposition est prolongée (Erlanson-Albertsson, 2005). De plus, il a été proposé qu'une alimentation maternelle hypercalorique en période périnatale, pourrait altérer le développement central des circuits de la récompense chez la descendance et augmenterait la probabilité de surconsommer des aliments palatables plus tard dans la vie (Vucetic et al, 2010, 2011). Il serait donc intéressant de voir les effets d'une restriction protéique maternelle sur le développement du système mésolimbique en fonction de la fenêtre de temps où l'empreinte métabolique a eu lieu.

Enfin, certaines régions cérébrales comme celle de l'hypothalamus, présentent une plasticité en réponse à l'environnement hormonal mais également nutritionnel et ce, même à l'âge adulte (Pinto et al, 2004; Benani et al, 2012; Gouazé et al, 2013). Il a par exemple été montré qu'un environnement nutritionnel hyperlipidique modifie les capacités de plasticité cérébrale, en particulier au niveau des neurones à POMC de l'hypothalamus, en altérant les niveaux de PSA-Ncam (polyasialic acid-neural cell adhesion molecule) (Benani et al, 2012) ou la capacité des neurones de l'ARC à adopter un phénotype à POMC (Gouazé et al, 2013), ce qui aurait pour conséquence l'apparition d'une hyperphagie associée à une augmentation de la masse adipeuse et corporelle. Cette hypothèse n'est peut-être pas valable pour expliquer l'hyperphagie observée chez les animaux du groupe CR. De fait, face à l'absence d'accrétion adipeuse chez ces animaux en situation obésogène, des mécanismes compensatoires doivent avoir lieu au niveau du métabolisme. L'étude de cette programmation en période d'allaitement représente donc un enjeu clef en terme de prévention.

2. L’empreinte nutritionnelle périnatale pourrait déterminer l’insulino-sensibilité périphérique par la programmation du métabolisme énergétique

Les résultats apportés par notre première étude ont mis en évidence que les modifications du comportement alimentaire ne pouvaient pas à elles seules expliquer les différences phénotypiques observées. L’étude du métabolisme réalisée au niveau systémique et à l’âge adulte aura dès lors permis de compléter l’éclairage que nous souhaitons apporter sur la physiologie des adaptations métaboliques consécutives à la programmation périnatale.

La pathogenèse du diabète de type 2 implique à la fois des dysfonctionnements dans la signalisation de l’insuline et dans sa sécrétion (événement physiopathologique majeur contribuant au développement du DT2M) (Saltiel, 2001). Or, les évidences quant à la notion de programmation de ces fonctions chez les individus nés avec un RCIU tendent à s’accumuler dans la littérature (Martin-Gronert & Ozanne, 2012; Duque-Guimaraes & Ozanne, 2013).

Les capacités sécrétoires des cellules β après un RCIU : un facteur limitant

La programmation *in utero* de la diminution des capacités sécrétoires des cellules β chez les individus de petit poids de naissance est reconnue et représente un facteur de risque principal dans le développement du DT2M lorsque ces individus sont exposés à un environnement nutritionnel pléthorique. Les altérations du pancréas endocrine – en plus d’une augmentation de l’apoptose des cellules β , d’une diminution de leur masse et d’une vascularisation réduite du pancréas (identifiées dans le modèle de restriction protéique maternelle chez le rat) (Dumortier et al, 2007) – ont été associées à des dysfonctionnements mitochondriaux et une augmentation de la production d’espèces réactives de l’oxygène qui conduisent à une diminution de la production d’ATP nécessaire à l’exocytose de l’insuline (Theys et al, 2011 ; Reusens et al, 2011). Une demande accrue en insuline, telle qu’en situation nutritionnelle sur-optimale, induirait rapidement une incapacité de l’organisme à subvenir aux besoins en insuline. D’autre part, il a été montré que les rats nés avec un RCIU du même modèle et ayant eu une de croissance postnatale rapide, présentent un phénotype prématuré de vieillissement des îlots de Langerhans, de part l’accélération du raccourcissement des télomères des chromosomes présents dans les cellules β , une augmentation du stress oxydant et une moindre capacité anti-oxydante de ces cellules (Tarry-Adkins et al, 2009). Les deux derniers paramètres étaient également présents chez la

descendance n'ayant pas fait l'expérience d'une croissance postnatale rapide (Tarry-Adkins et al, 2010).

La programmation d'une signalisation délétère de l'insuline est-elle déterminante dans le développement d'une insulino-résistance ?

Si de faibles capacités sécrétoires en insuline apparaissent comme un facteur précoce et déterminant dans le développement du DT2M, l'installation de l'insulino-résistance n'est pas pour autant négligeable dans le risque accru des individus nés avec un RCIU de développer un DT2M à l'âge adulte. Les mêmes altérations dans la signalisation de l'insuline au niveau adipeux et musculaire ont été retrouvées chez des hommes jeunes nés avec un petit poids et chez des rats de quelques mois nés avec un RCIU induit par une restriction protéique maternelle. Parmi ces altérations, une diminution de l'expression des protéines suivantes : GLUT4, IRS1 ainsi que les sous-unités p85 α et p110 β de la protéine PI3-kinase (Ozanne et al, 2001, 2003, 2005, 2006). Les altérations observées auraient lieu à un niveau post-transcriptionnel, les niveaux d'ARNm étant inchangés.

Pour autant, une tolérance au glucose normale et une faible sécrétion en insuline sont observées chez les jeunes animaux, reflet d'une hypersensibilité des tissus périphériques à l'insuline durant cette période de la vie, comme nous avons pu le retrouver dans nos travaux. On peut imaginer que cette hypersensibilité observée chez le jeune adulte soit la résultante d'un phénomène compensatoire ou d'adaptation induit par l'environnement périnatal délétère. Une adaptation des tissus périphériques où une augmentation du nombre de récepteurs à l'insuline dans le foie, le tissu adipeux et le muscle a notamment été décrite (Ozanne et al, 1996; Sherpherd et al, 1997; Holness et al, 1999). Malgré cette adaptation, une perte progressive de la sensibilité des tissus périphériques est observée conduisant à l'installation progressive d'une insulino-résistance chez ces animaux tout comme chez l'Homme.

Le métabolisme lipidique, à l'origine de l'insulino-résistance chez les individus de petit poids de naissance ?

Il est difficile d'identifier l'orchestration précise des dérégulations biologiques programmées à un âge précoce qui pourraient expliquer la perte progressive de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. En effet, les mécanismes impliqués dans la séquence du développement de l'insulino-résistance restent, de façon générale, divers et encore matière à débat. Des théories récentes proposent qu'une dérégulation du métabolisme glucidique (au-delà de son étroite relation avec l'insuline), lipidique ou même protéique pourrait être

directement impliquée dans l'induction de l'insulino-résistance. Les études cliniques réalisées par approche métabolomique ont permis de révéler des signatures métaboliques spécifiques au niveau plasmatique des acides aminés et des acides gras chez des personnes obèses, intolérantes au glucose ou encore diabétiques avec des disparités des profils dans les différentes études selon le sexe, l'ethnie mais aussi l'âge des sujets analysés (Salek et al, 2007; Newgard et al, 2009; Zhao et al, 2010; Kim et al, 2010; Mihalik et al, 2012), mais probablement également dépendantes du mode de vie.

Ces signatures spécifiques ont notamment mis l'accent sur le métabolisme des acides aminés à chaîne branchée (BCCA), dont les concentrations circulantes plus élevées, résultant de l'apport alimentaire, du patrimoine génétique ou de l'activité du microbiote intestinal (Shah et al, 2011) pourraient avoir un impact délétère sur l'homéostasie glucidique. Il a été proposé qu'une augmentation des espèces intermédiaires du catabolisme des BCAA, tels que les acylcarnitines C3- et C5-, pourrait interférer avec la voie signalisation de l'insuline notamment par l'activation de la voie mTOR/S6K1 qui à son tour induit la phosphorylation de l'IRS1 sur plusieurs sérines et contribue alors au développement de l'insulino-résistance par la baisse de l'action de l'insuline (Newgard et al, 2009). Des concentrations importantes en BCAA pourraient également favoriser la production de glucose par la voie de la gluconéogenèse. Nos résultats montrent en effet une signature spécifique en acides aminés (BCAA et autres acides aminés) chez le groupe RC qui, associée à d'autres paramètres, irait plus dans le sens d'une augmentation de la production hépatique de glucose, comme proposé dernièrement au travers de mécanismes épigénétiques (Vo et al, 2013).

Les anomalies associées à un changement du métabolisme lipidique – à savoir des dépôts adipeux ectopiques et une altération de l'oxydation des acides gras – pourraient également avoir un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance. Ces altérations pourraient être le résultat d'une programmation périnatale. En effet, une obésité viscérale semble programmée chez les individus nés avec un RCIU (Guan et al, 2005). En réponse à une exposition chronique à un régime de type Occidental, nos travaux montrent également que les rats nés avec un RCIU, quelle que soit la vitesse de croissance postnatale, ont une plus forte propension à accumuler de la masse grasse abdominale. Cependant, de part la technique utilisée, il ne nous a pas été possible de distinguer si l'accrétion adipeuse abdominale était viscérale et/ou sous cutanée. Or l'obésité viscérale est associée à une augmentation des flux en AGNE dans la circulation portale, et donc au risque d'avoir une accrétion adipeuse et notamment de dérivés des triglycérides (dyglycérides, céramides, acylCoA) au niveau hépatique ou dans d'autres tissus. Ce phénomène est à l'origine du

développement d'une lipotoxicité cellulaire (Unger, 1995). De plus, il a récemment été proposé qu'une β -oxydation mitochondriale incomplète des acides gras (Koves et al, 2008) aurait des effets beaucoup plus délétères sur la signalisation de l'insuline plutôt qu'une accumulation ectopique de triglycérides. L'étude du métabolome plasmatique de rats nés avec un RCIU, lors de travaux précédent issus de notre laboratoire, a notamment pointé des différences dans les teneurs en carnitine et sur quelques acylcarnitines (détectables et identifiables par cette méthode) dépendant de la trajectoire de croissance pré- et postnatale (Alexandre-Gouabau et al, 2011). Alors que les rats RC tendraient à montrer une diminution de l'oxydation des acides gras, les résultats de notre seconde étude et l'analyse complète des profils en acylcarnitines vont dans le sens d'une β -oxydation incomplète des rats du groupe RR conjointe à une perte de l'hypersensibilité des tissus périphériques à l'insuline en situation obésogène. Ainsi, sur le long terme, ces dérégulations du métabolisme lipidique et leur interférence avec la signalisation de l'insuline pourraient engendrer une perte progressive de l'insulino-sensibilité des tissus périphériques. Cet effet serait prolongé jusqu'à un certain stade, où le système ne pourrait plus maintenir l'équilibre (capacités sécrétoires en insuline épuisées) provoquant la dérégulation complète de l'homéostasie glucidique et énergétique de façon générale.

Un autre acteur majeur de l'insulino-résistance

Des données récentes sur le rôle microbiote intestinal dans le développement de maladies métaboliques telles que l'obésité et le DT2M sont maintenant disponibles (Tremaroli & Buckhed, 2012; Clemence et al, 2012; Koren et al, 2012). Puisqu'il a été montré que la colonisation par le microbiote commence *in utero* et qu'elle dépend du microbiote maternel ainsi que de la nutrition pendant l'allaitement (Nicholson et al, 2012), ce nouvel élément mérite une attention particulière et doit être étudié dans le concept de programmation nutritionnelle.

Poursuivre les études fondamentales visant à identifier l'impact d'une nutrition périnatale délétère selon des fenêtres de temps précoces (c.à.d. gestation et/ou lactation) sur le métabolisme énergétique précoce s'avère ainsi nécessaire pour la compréhension des mécanismes engagés dans 1) la perte progressive d'insulino-sensibilité accompagnée d'une accréation adipeuse ou 2) l'absence de perte d'insulino-sensibilité et d'accréation adipeuse en condition obésogène. En effet, les animaux du groupe CR présentent un phénotype singulier. Bien qu'exposés à un régime obésogène, ils présentent une accréation adipeuse et un gain de

poids négligeables. Peu d'éléments dans la littérature permettent d'expliquer ce phénotype. Pour autant, notre étude laisse présager un ensemble d'adaptations métaboliques au niveau hépatiques et plus largement dans l'utilisation des substrats lipidiques au regard des profils en acylcarnitines. L'étude de leur métabolisme précoce face à l'apport nutritionnel reçu (via le lait) représente ainsi un enjeu déterminant dans la compréhension des adaptations métaboliques sous-jacentes. Sur le long terme, ces avancées permettraient éventuellement de dessiner des stratégies interventionnelles ou d'optimiser la nutrition du nourrisson pour atténuer certains risques métaboliques.

3. Nos perspectives de travail à l'issu de ces résultats

De nombreuses perspectives de travail sont ainsi envisageables à l'issu de ces travaux de thèse. Nos interrogations ce sont davantage portées sur le métabolisme central et sur la nutrition postnatale reçue par la descendance, quelle que soit leur croissance prénatale et son impact sur la trajectoire métabolique. Le dernier axe sera développé dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

Qu'en est-il de l'empreinte sur le métabolisme énergétique au niveau central ?

Au regard des différences observées au niveau du métabolisme périphérique, il est légitime de s'interroger sur le métabolisme au niveau central. Ce dernier pourrait lui-même être modifié et être à l'origine des altérations observées au niveau périphérique. Bien que l'hypothèse du phénotype économe souligne que face à un environnement nutritionnel périnatal délétère l'allocation des nutriments est davantage orientée vers le cerveau pour préserver son développement et ses fonctions, il n'est pas impossible que son métabolisme soit tout de même modifié. À ce jour, il n'existe aucune information sur le phénotypage global du métabolome hypothalamique suite à une empreinte métabolique exercée en période pré- et/ou postnatale et induite par une restriction protéique maternelle. Pour cela nous avons réalisé des prises d'empreintes à la naissance, à 16 jours de vie ainsi qu'à l'âge adulte sur des animaux ayant eu une trajectoire de croissance prénatale et/ou postnatale modifiée et ayant reçu un régime obésogène ou non à l'âge adulte.

Le dépouillement de ces données générées par approche intégrative nous permettra de prospecter sur la question suivante : Quel est l'impact d'une restriction protéique maternelle en période périnatale sur l'empreinte métabolique induite sur le métabolisme énergétique précoce et pérenne de l'hypothalamus de la descendance mâle chez le rat ?

Chapitre 3 :

Résultats sur l'impact du régime maternel en période périnatale sur la composition du lait et le métabolisme précoce de la descendance

Article 3:

Perinatal maternal protein restriction modulates milk composition and impacts short-term offspring growth

Martin Agnoux A., Antignac J.-P., Boquien C.Y., David A., Desnots E., Ferchaud-Roucher V., Parnet P., Alexandre-Gouabau M.-C.

Soumis à British Journal of Nutrition

Le concept du DOHaD souligne que les fenêtres de temps précoces, tant la période fœtale que la période néonatale, sont décisives en termes de programmation de la santé future et de risque de développer des maladies à l'âge adulte (Hales et al, 1991; Hales & Barker, 2001; Sullivan & Grove, 2010; Charles et al, 1994; Weiss et al, 2001). La période d'allaitement apparaît donc être une fenêtre d'étude clef dans cette programmation et éveille de plus en plus l'intérêt des communautés pédiatriques et scientifiques du fait que le lait représente une cible médicale accessible tant en termes de prévention que de traitement.

Le lait maternel aurait des effets protecteurs sur la santé future de l'adulte et l'OMS recommande un allaitement exclusif jusqu'à 6 mois d'âge. Différentes études cliniques tendent à montrer que les nourrissons ayant été allaités, en comparaison de ceux ayant reçu un lait maternisé (Ziegler et al, 2007), présentent un risque moins important de développer une obésité pendant l'enfance (Armstrong & Reilly, 2002; Arenz et al, 2004) comme à l'âge adulte (Harder et al, 2005). Les mécanismes en amont de cette programmation restent néanmoins peu décrits mais pourraient être à l'origine d'adaptations métaboliques précoces. D'autre part, il apparaît que la nutrition maternelle module la composition qualitative du lait (Hall, 1979; Beare, 1961; Green et al, 1981; Grigor & Warren, 1980; Del Prado et al, 1997; [Rolls & Gurr, 1986](#)). Par ailleurs les études cliniques et expérimentales ont mis en évidence que le régime maternel périnatal était déterminant dans la programmation du phénotype et du métabolisme de la descendance (Fernandez-Twinn & Ozanne, 2010; Ornoy, 2011; Barnes & Ozanne, 2011). Il a notamment été montré, au travers d'études réalisées chez le rongeur, qu'une restriction protéique maternelle pouvait moduler les trajectoires de croissance pré- et postnatale de la descendance et avoir des conséquences pérennes sur leur métabolisme pouvant être bénéfiques ou néfastes malgré le fait que la descendance ait été allaitée (Ozanne et al, 2004; Zambrano et al, 2008; Martin Agnoux et al, submitted).

Au regard de ces données, il apparaît donc nécessaire d'examiner plus précisément les effets d'une restriction protéique maternelle sur la composition du lait et les conséquences que pourraient avoir le lait sur le métabolisme précoce de la descendance selon que la croissance prénatale ait été altérée ou non. C'est dans cette perspective que nous avons bâti nos travaux durant ce troisième volet de thèse.

Dans un premier temps, nous avons examiné de façon étendue, mais non exhaustive la composition du lait et ses variations tout au long de la période d'allaitement, ainsi que l'impact que pouvait avoir une restriction protéique maternelle périnatale sur la composition du lait. Pour se faire, nous avons évalué 1) la composition en macronutriments du lait, 2) ses teneurs en acides aminés libres, 3) les concentrations et la composition en acides gras ainsi que 4) la signature métabolomique du lait à différents stades de la période d'allaitement.

Dans un deuxième temps, nous avons examiné l'impact que pouvait avoir ce lait sur les concentrations en insuline à différents temps de cinétique pendant la période d'allaitement ainsi que sur la croissance d'organes clefs au moment du sevrage des rats, selon la croissance prénatale.

Résultats marquants

Au cours de cette étude, nous avons voulu aller plus loin dans la caractérisation du lait et les effets que pouvaient avoir une restriction protéique maternelle en période périnatale sur sa composition. À notre connaissance, il s'agit de la première étude à s'être intéressée à cette problématique de façon aussi étendue tout au long de la période d'allaitement. Il s'agit également de la première étude à s'être intéressée à la composition du lait dans un modèle de restriction protéique maternelle communément utilisé chez le rongeur pour l'étude de la programmation métabolique de la descendance où les mères sont restreintes en protéines pendant les fenêtres périnatales de gestation et de lactation. En effet, parmi les quelques études ayant analysé la composition du lait, les données disponibles portent sur le lait de rates exposées à un régime hypoprotidique uniquement en période d'allaitement.

Les résultats de ce troisième volet de notre travail de thèse confirment que l'alimentation est un facteur déterminant dans la composition du lait. Une restriction protéique imposée aux rates en période périnatale (3 semaines en gestation et 3 semaines en lactation) – à hauteur de 8% (rates R) contre 20% pour les rates nourries avec un régime

contrôle (rates C) – engendre des modifications des teneurs du lait en macronutriments, en acides aminés libres, et en acides gras, et montre également une signature métabolomique différente du lait selon le régime maternel.

1) Malgré un régime restreint en protéines, les teneurs en protéines du lait des rates R sont similaires à celles mesurées dans le lait des rates recevant un régime contrôle, bien qu'une diminution transitoire à 14 jours de lactation soit observée dans le lait des rates R. Ce maintien des concentrations en protéines du lait suggère la mise en jeu de plusieurs mécanismes adaptatifs chez les rates R, dont une modification de la physiologie de la glande mammaire mais aussi une mobilisation plus importante des réserves protéiques maternelles au regard de la perte de poids plus importante observée chez les rates R par rapport aux rates C de la mise bas au sevrage. D'autre part, le lait des rates R présente une augmentation des concentrations en lipides tout au long de la période d'allaitement, ce qui souligne une activité lipogénique plus importante de la glande mammaire de ces rates et/ou une mobilisation plus importante de la masse adipeuse des rates R au vu, encore une fois, de leur perte de poids pendant cette période. L'ensemble de ces résultats est associé à une consommation alimentaire et des concentrations en glucose plus faibles chez les rates R par rapport aux rates C. Globalement, ces résultats mettent ainsi en évidence une augmentation de la valeur énergétique du lait des rates soumises à une restriction protéique (R).

2) D'autre part, les résultats apportent un ensemble d'éléments nouveaux quant à la caractérisation évolutive des teneurs en acides aminés libres présents dans le lait selon le régime maternel, qui pourraient expliquer les différentes trajectoires de croissance postnatales des ratons définies selon le régime maternel. Les concentrations en acides aminés libre du lait, indispensables pour assurer une croissance optimale de la descendance, sont modulées par la restriction protéique maternelle, avec une diminution marquée de la proline, de la leucine et de la thréonine tout au long de la période d'allaitement, et une réduction de l'ensemble des acides aminés libres en fin d'allaitement. D'autre part, le lait R présente également une diminution des concentrations de l'ensemble des acides aminés libres aux propriétés insulino-trophiques. Ces données sont associées à des concentrations plus faibles en insuline chez les ratons allaités par ces mêmes rates (RR et CR) par rapport à ceux allaités par les rates nourries par un régime contrôle (CC et RC). L'ensemble de ces résultats pourraient en partie contribuer à la plus faible croissance postnatale des ratons allaités par des rates R par rapport à ceux allaités par les rates C, quelle que soit la trajectoire de croissance prénatale.

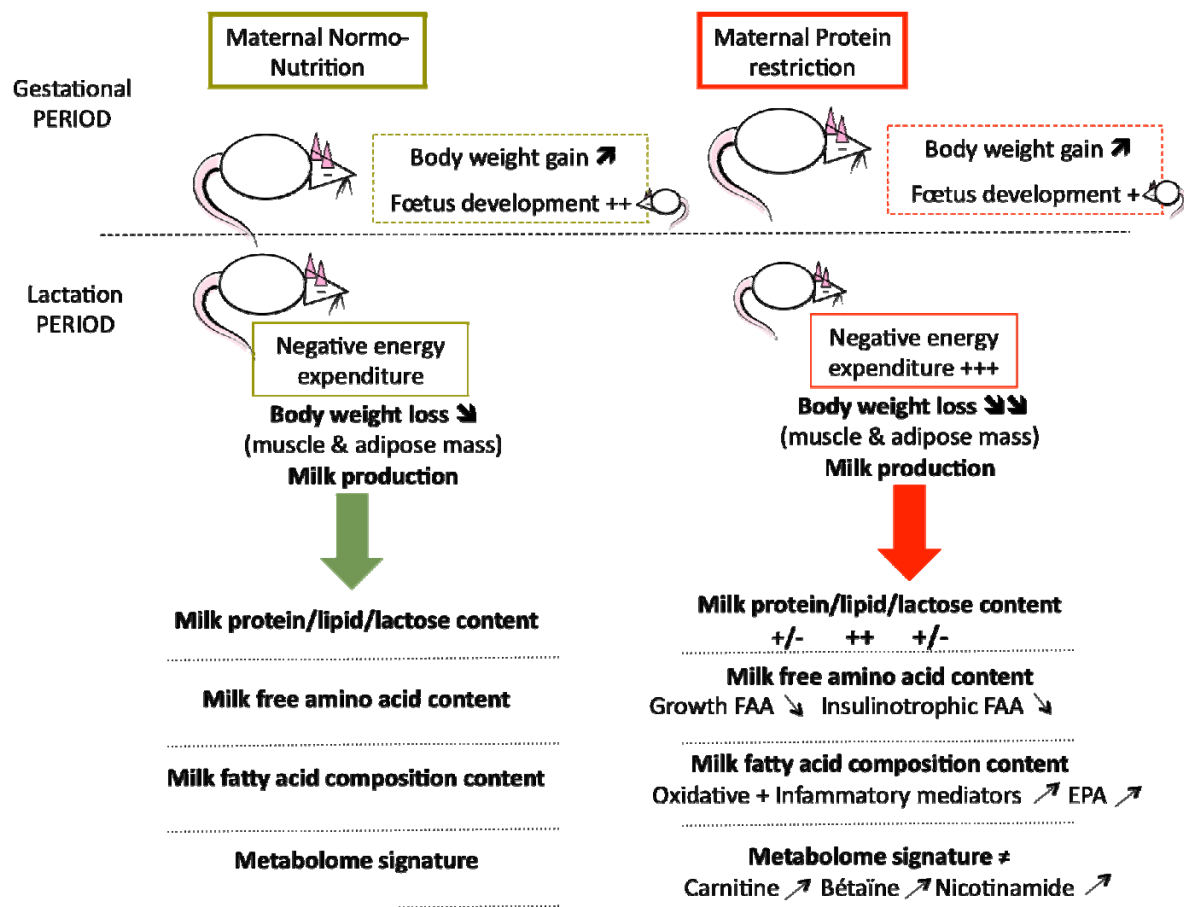


Figure 21. Schéma bilan des principales observations extraites de l'étude 3 sur la composition du lait suite à l'exposition des rates à une restriction protéique pendant les périodes de gestation et de lactation.

+/- : quantités parfois supérieures ou inférieures par rapport aux concentrations du lait des rates contrôles pour un temps donné au cours de l'allaitement.

FAA: free amino acid

EPA : eicosapentaenoic acid (cis C20 :5 n-3)

3) Enfin, notre étude met en évidence un ensemble de modifications en acides aminés libres et en acides gras qui pourrait modifier le statut redox et inflammatoire du lait des rates R, en parallèle de composés pouvant favoriser la β -oxydation chez les ratons allaités par ces rates restreintes en protéines. En effet, le lait des rates R présente une diminution des concentrations en acides aminés sulfurés, en glycine et cystéine – précurseurs du glutathion – et en tryptophane, ce qui pourrait refléter une réduction des propriétés anti-oxydantes du lait associé à une augmentation d'acides gras saturés et mono-insaturés qui décrirait un statut pro-oxydant du lait. D'autre part, le lait des rates R pourrait présenter un statut pro-inflammatoire au vu du ratio n-6/n-3 plus élevé mais aussi au regard des concentrations plus importantes en acide linoléique et en acide arachidonique, acides gras précurseurs de médiateurs de l'inflammation. En parallèle de ces propriétés biologiques plutôt délétères sur la composition du lait des rates restreintes en protéines, le lait R contient des concentrations plus importantes en acide eicosapentaénoïque (EPA) et en carnitine par rapport au lait C ce qui pourraient contribuer dans la programmation d'une hyperinsulino-sensibilité des tissus périphériques et de l'homéostasie en carnitine chez nos rats adultes recevant le lait R en période d'allaitement (rats des groupes RR et CR) présentés dans l'article 2.

Pour conclure, notre étude est la première à décrire avec précision la composition du lait dans un modèle de programmation métabolique par restriction protéique maternelle au cours des périodes de gestation et de lactation (Figure 21). Cette étude permet d'approfondir les connaissances sur la composition du lait et propose diverses pistes quant à la contribution du lait dans le développement néonatal de la descendance et la programmation de leur métabolisme sur le long terme. Ces résultats laissent entrevoir l'existence d'un ensemble d'adaptations métaboliques chez la descendance selon la trajectoire de croissance prénatale combinée à la qualité du lait reçu pendant les premiers jours de vie qui pourraient éclairer sur les différentes adaptations du comportement alimentaire et de l'homéostasie énergétique observées sur le long terme dans nos deux études précédentes.

Perinatal maternal protein restriction modulates milk composition and impacts short-term
offspring growth

A. Martin Agnoux ^{1,2}, J.-P. Antignac ³, C.Y. Boquien ^{1,2}, A. David ^{1,2}, E. Desnots ^{1,2}, V.
Ferchaud-Roucher ^{1,2}, P. Parnet ^{1,2}, M.-C. Alexandre-Gouabau ^{1,2}

¹ INRA, UMR1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Institut des maladies de
l'appareil digestif (IMAD), Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest (CRNH),
Nantes, France

² LUNAM, Institut des maladies de l'appareil digestif (IMAD), Centre de Recherche en
Nutrition Humaine Ouest (CRNH), Nantes, France

³ LUNAM, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments
(LABERCA), USC INRA 1329, Nantes, France.

* To whom correspondence should be addressed: Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Institut
National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1280, Laboratoire de
Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu,
Place Alexis Ricordeau, HNB1, 44093 Nantes Cedex 1, France (EU) Phone : 33 2 53 48 20
12 ; Fax : 33 2 53 48 20 03 ; E-mail: Marie-Cecile.Alexandre-Gouabau@univ-nantes.fr

Running Title: Perinatal maternal diet impacts milk content

Key words: **maternal protein restriction, milk composition, free amino acids, fatty acids,
metabolome, organ growth**

Abstract

Special attention has been paid to the impact of perinatal nutrition on birth and later health outcomes in the concept of metabolic imprinting. A major gap in understanding these relationships concerns the effect of maternal nutrition on milk composition, the only channel through which nutrients are postnatally transferred from mother to offspring. The present study investigates, in a rat programming model, the effects of maternal isocaloric low-protein diet during gestation and lactation on milk composition. We addressed this issue by using an integrated methodological approach that combined targeted analyses of macronutrients, free amino acids, and fatty acids content throughout lactation, with an untargeted mass spectrometric-based metabolomic phenotyping. Results showed that perinatal maternal low-protein diet had no effect on milk protein content while we measured a reduction of most free amino acids and in lactose levels at the end of lactation, and an increased in total fatty acids content along the all lactation, specifically in the well characterized saturated and monounsaturated long-chain fatty acids. Interestingly, a decrease of several insulinemic and glycemic amino acids and an increase of eicosapentanoic acid suggested that a maternal protein restriction during the perinatal period induces a modulation in the insulinotrophic status of dams milk that may account greatly for the lower growth of the suckled male offspring. Additionally, the decrease in sulfur amino acids underlies alterations in milk redox status. Altogether, our results show that milk composition is clearly influenced by diet and may be a key determinant of offspring growth and metabolic programming.

Introduction

Extensive epidemiological and experimental studies suggest that a deleterious nutritional environment inflicted during fetal and early postnatal life could impact long-term health. This has been described as the metabolic programming concept ¹ where lactation period represents one of the most important neonatal factors involved in developmental and metabolic programming.

For the majority of neonates, breast milk is the first food received after birth and given up to the age of 4 to 6 months in many countries and especially in developing ones. World Health Organization defined that breast milk is the best infant nutrition during postnatal development ^{2,3} and according to the WHO breastfeeding should be exclusive for the first 6 months of life since it contains many bioactive factors ⁴⁻⁶, such as high content in IgA ⁷, lactoferrine ⁸ and non-protein nitrogen ⁹ known as important determinants for healthy infant development. Analyses have reported that breastfeeding has a protective effect on infectious risk ¹⁰, and could prevent obesity onset in childhood and adulthood ¹¹ as well as the development of type 2 diabetes in adult life ¹². These elements underlie the critical role of breastfeeding in appropriate infants' growth and development. However, it remains difficult to accord a causal relationship between breastfeeding and metabolic diseases prevention. The protective role of breastfeeding against metabolic diseases may be explained by a number of potential determinants including maternal metabolic status, infant feeding behaviors, and milk composition ^{13,14}. On the other hand, there is a lack of comprehension of the specific needs of infants who experienced complicated fetal growth as intra-uterine growth restricted (IUGR) newborns, which are characterized by a low birth weight. It is indeed well documented that low birth weight babies present a higher susceptibility to develop obesity, insulin resistance, cardiovascular diseases, and type 2 diabetes later in life ¹⁵⁻¹⁷.

In this context, we postulated that perinatal maternal levels of protein intake could impact milk composition and therefore could contribute heavily to the lasting effects in growth and metabolism observed in offspring that experienced modifications in their perinatal growth trajectories.

To address that hypothesis in a rat model, we compared milk composition between dams fed a normo-protein diet (20%) or a protein-restricted diet (8%) and followed growth curve, organs development, and insulinemia of the male offspring from birth to post-weaning. An untargeted mass spectrometric-based metabolomic approach was combined with other targeted measurements focusing on milk components important for growth ¹⁸, as free amino

acids (FAA) and fatty acids (FA) that depends on maternal diet¹⁹⁻²² since already published informations related to these components in milk and specifically after a maternal protein restriction remain extremely scarce. Physiologic maternal status was also examined during the critical periods of gestation and lactation.

To our knowledge, this is the first integrated study that describes the milk composition at different stages of lactation according to maternal protein intake during gestation and lactation. We found evidences for changes in total fat, fatty acids and free amino acids content in dams exposed to a protein-restricted diet during gestation and lactation and we discussed the possible contribution of these variations in offspring growth and metabolism.

Material and Methods

Ethics statement

The experimental protocol was formally approved by the institutional ethical committed and registered under the reference CEEA.2011.4. It was carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24th 1986 (86/609/EEC), the Institut National de la Recherche Agronomique (Paris, France) and the French Veterinary Department (A44276) guidelines.

Animal Experiments, housing and diets

We used an established model of metabolic programming previously described elsewhere^{23,24}. Briefly, virgin female Sprague Dawley rats, housed individually, were time mated, and received *ad libitum* isocaloric diets throughout gestation and lactation containing either 20% protein (control diet, C, n=16) or 8% protein (protein-restricted diet, R, n=16). Both diets were purchased from Arie Blok (Woerden, The Netherlands) and their composition is provided in Table S1. At birth, litter size was adjusted to eight pups (male or female) per dam. Pups born from protein-restricted dams were randomly attributed to C or R dams for lactation, leading to the RC and RR groups of animals, respectively (Figure 1A). During suckling period, pups born from control dams were adopted by C or R dams, leading to the CC and CR groups of animals, respectively (Figure 1A). To avoid bias on measured parameters, only pups reared by mothers whose milk was not collected were analysed. Similarly, from weaning (21 days), all male pups suckled by mothers whom milk was not taken were housed individually and fed a control protein diet containing 20% protein. Full study design is depicted in figure 1B.

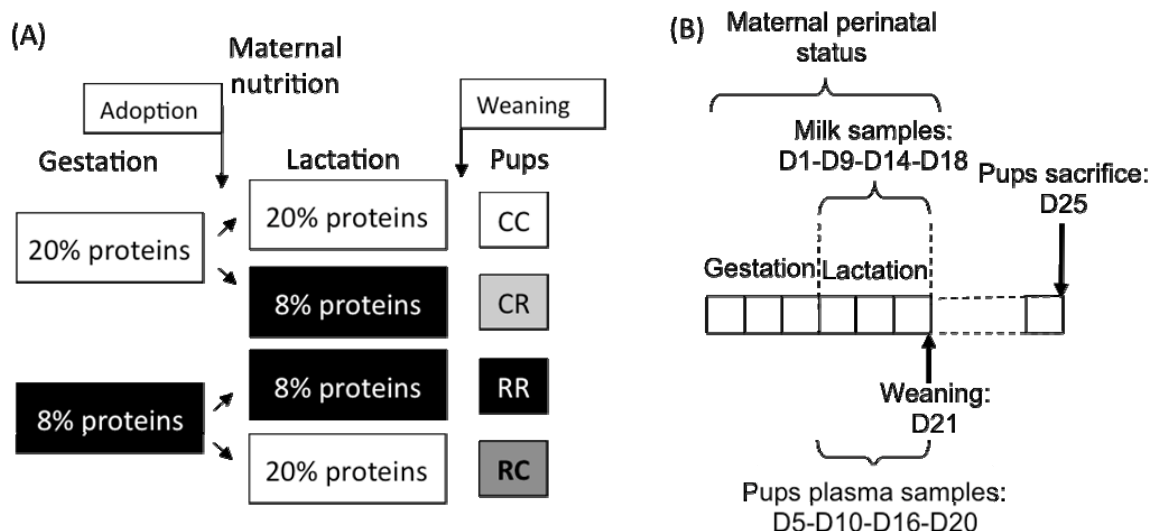


Figure 1. (A) Schematic diagram of the study design.

Two groups of dams were obtained and studied throughout gestation and lactation period whereas four groups of offspring rats were achieved and were examined at weaning and in adulthood. (B) Time schedule used to monitor milk composition (n=6-13), dams physiological parameters, and insulin levels as well as body composition of the CC, RC, RR and CR offspring rats during lactation period and at D25, respectively (n=8-10). C: Control; R: Restricted; D: Day.

Food intake, blood and body fat mass collection

Dams 24h food intake (g) was calculated at different stages of the gestation and lactation periods. Dams body weight gain (BWG) was calculated throughout gestation and lactation. Pups body weight was recorded at birth then every morning until weaning. Special care was taken to perform all killing at the same period of the day (8 a.m to 12 a.m.) to prevent the bias due to circadian variations in metabolic expression. Sacrificed of pups were done at day (D): 0-5-10-16-20-25. Blood was collected from trunk in pups in tubes with EDTA (Pfizer-Centravet, Plancoët, France) and centrifuged at 2500 rpm for 15 min at 4°C. Plasma was collected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until subsequent analysis for insulin (Eurobio, Rat Insulin ELISA kit, France) at every kinetic time point except at D25. Organs and adipose tissues were weighed after sacrifices of 25-day-old pups. Bilateral fat pads from 3 distinct regions (retroperitoneal, perirenal and epididymal) were dissected, weighed and summed to get the total visceral white adipose tissue mass.

Milk samples collection

Milk samples were collected from C and R lactating dams at 1, 9, 14 and 18 days of lactation as described previously²⁰. Briefly, pups were removed from their mothers 2 hours before the

milk sampling. Food tray was removed from the mother. The maternal separation period was of 2 hours in order to avoid a prolonged milk stasis within the mammary gland and to get a better reflect of milk that suckling pups normally received ²⁰. Dams were anesthetized with 2 to 2.5 % of isofluran for 1.5 L/min of oxygen, placed on mats heated, nipples were disinfected with ethanol and hair around nipples was shaved. Dams received an intraperitoneal injection of oxytocin (1 unit of Syntocinon; Sigma-Tau, Ivry sur Seine, France) to stimulate milk ejection. After twenty minutes, milking was help by applying manual pressure to all nipples. Milk was collected until milk flow ceased. 0.5 to 1.5 ml of milk was collected from each dam and was immediately frozen at -80°C until subsequent analysis. Before milk collection and anaesthesia, blood glucose levels were monitored from vein tail using a glucometer (Accu-CheckH active®, Roche Diagnostics).

Milk protein and lactose measurements

The total protein concentration in milk samples was determined by using a colorimetric DC Protein assay based on the well-documented Lowry assay (Bio-Rad, Hercules, CA) on 10 µL of milk diluted in 200 µL of water. Milk lactose concentration was estimated using an enzymatically lactose test kit (Boehringer Mannheim, Darmstadt, Germany). All of the above analyses were performed in each individual milk samples (10-14 samples for C and R dams at each kinetic point, except n=6 at 9 days of lactation).

Free amino acids (FAA) quantification in milk

Milk samples were prepared as previously described ²⁵. Briefly, 150 µL of ultrapure water and 25 µL of labelled internal standard pool (17 [¹⁵N, ¹³C or ²H]-labelled amino acids) were added into a 50 µL aliquot of each milk sample. Samples were mixed and skimmed by centrifugation at 10 000 g for 15 min at 4°C and deproteinized by adding 20 µL of a 10% (wt/v) solution of sulfosalicylic acid. Then, FAA were derivatized by adding a mixture of 70 µL of AccQ•Tag™ Ultra Borate Buffer, 10 µL of supernatant and 20 µL of AccQ•Tag™ Ultra reagent (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate), followed by incubation for 10 min at 55°C. The derivatized milk samples were analyzed by UPLC-MS/MS analysis performed on an Acquity H-Class® UPLC system (Waters Corporation, Milford, USA) equipped with a Waters AccQ•Tag™ Ultra column and coupled with a tandem quadrupole detector. The used UPLC-MS/MS analysis workflow was previously described by our group ²⁵. Signal acquisition was performed using the Multiple Reaction Monitoring mode after

electrospray ionisation in positive mode. Integration and quantitation were performed using the Waters TargetLinksTM software.

Fatty acids (FA) analysis in milk

Milk total lipids were not fractionated. They were extracted from 25 μ L of milk with a 100 μ L methanol-chloroform mix (1:1, v/v) according to Bligh & Dyer method ²⁶. Before extraction, 25 μ L of sodium chloride 150 mM and 25 μ L internal standard heptadecanoic acid 10mg/mL (C17:0; Sigma, France) were added. Two other extractions with 50 μ L chloroform were performed and then centrifuged (10 000 g for 10 min) to recover the extracts. The organic phases were dried under N₂. One mL of toluene was added to dissolve triglycerides. Total fatty acids were transesterified using 1mL of trifluoride in methanol (BF₃; Sigma France) for 45 min at 100°C ²⁷. Fatty acid methyl esters were extracted by addition of 0.25 mL of water and 0.50 mL of hexane, and analysed by gaz chromatography using an Agilent Technologies 7890A instrument equipped with a splitless injector (20:1) and a fused silica capillary Elite 225 column (30 m x 0.32 mm, 0.25 μ m, Perkin Elmer France). H₂ was used as carrier gas at 1mL/min. The column temperature program started at 35°C for 2 min, ramped at 15°C/min to 180°C for 2 min then ramped at 10°C/min to 220°C for 10 min. Temperature of injector and flame ionisation detector were 250°C. Individual fatty acids were identified by comparison of their retention time with those of standards: FAME mix (cat 47885-U 37, Supelco); n-3 PUFA from menhaden oil (cat 4-7085 U-14, Supelco), and marine oil standard of the AOCS. Peak surfaces were integrated and corrected by response factors of individual fatty acids. Results were expressed as percentage of each FA to the total identified fatty acids and, in Table 3, as μ g 100 μ L⁻¹ of milk and the sum of fatty acids content was assessed to reflect milk total lipids (triacylglycerols and phospholipids) content.

Non-targeted milk phenotyping by LC-HRMS metabolomic

The used MS-based metabolomic fingerprinting workflow was previously applied and described by our group ^{28,29}. Milk samples aliquots (50 μ L) of all dams were submitted to the following preliminary treatment before their analysis: 200 μ L of a methanol-chloroform mixture (1:1, v/v) and 50 μ L of sodium chloride 150 mM were added to each sample. Then, two extractions with 100 μ L chloroform were performed and after centrifugation (10 000 g for 10 min), the organic layers were dried under N₂ and reconstituted in 100 μ L of acetonitrile-water (30:70, v/v). Extracts were analysed by reverse phase liquid chromatography coupled to high-resolution MS (HPLC-ESI-HRMS) using a quadrupole-time of flight (Q-TOF) hybrid

instrument (SYNAPT[®]G2, Waters, Manchester, UK) operating in positive or negative electrospray ionization mode and in full scan acquisition mode at a 30,000 resolution FWHM. Annotation of the generated metabolomic profiles and subsequent identification of putative metabolites/biomarkers of interest were achieved using an in-house reference databank³⁰.

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM in tables and as median [min-max] in figures. Differences among groups were analysed by Mann-Whitney U-test using GraphPad Prism[®] software version 5.00. Differences with $p < 0.05$ were considered as significant.

Metabolomic data were processed using the open-source XCMS[®] software²⁸. Processed metabolomic data were analysed by multivariate statistical analysis, using SIMCA-P⁺ software (version 12, Umetrics Inc., Umeå, Sweden). An unsupervised principal component analysis (PCA) was first performed (on pareto scaled initial LC-HRMS spectral data) to visualize the general structure of the generated data set and identify potential atypical or outlier individual data. Subsequently, a supervised multivariate data analytical tool, orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA), was applied to analyze the LC-HRMS spectral data^{31,32}. OPLS-DA maximizes the separation according to class (i.e. treated or not treated groups) in a single component used as a predictor for the class, while the other components describe the unwanted variation (“structured noise”) orthogonal to the first predictive component. This facilitates the identification of variables discriminating the classes. The quality of the generated OPLS-DA models was evaluated by several goodness-of-fit parameters previously described³¹ and used in our lab²⁸ and others³³: R2 (X), defining the proportion of the total variance of the dependent variables that is explained by the model, R2 (Y), the proportion of the total variance of the response variable explained by the model (i.e. the class of the samples), and the predictive ability parameter Q2, which was calculated by a seven-round internal cross-validation of the data and provides a measure of the model quality with Q2 above 0.5 considered as ‘good’. For OPLS-DA models, p -value < 0.05 were considered as significant.

Results

Perinatal maternal food intake, body weight gain and glycaemia

Protein reduction in the diet had no impact on dams food intake during gestation (Figure 2A) and led to a reduced dams body weight gain (Figure 2C). Compared to control dams, protein-restricted dams ate less (Figure 2B) and lost more weight after delivery and throughout lactation period (Figure 2D), and had a lower glycaemia (Figure 2E) during lactation.

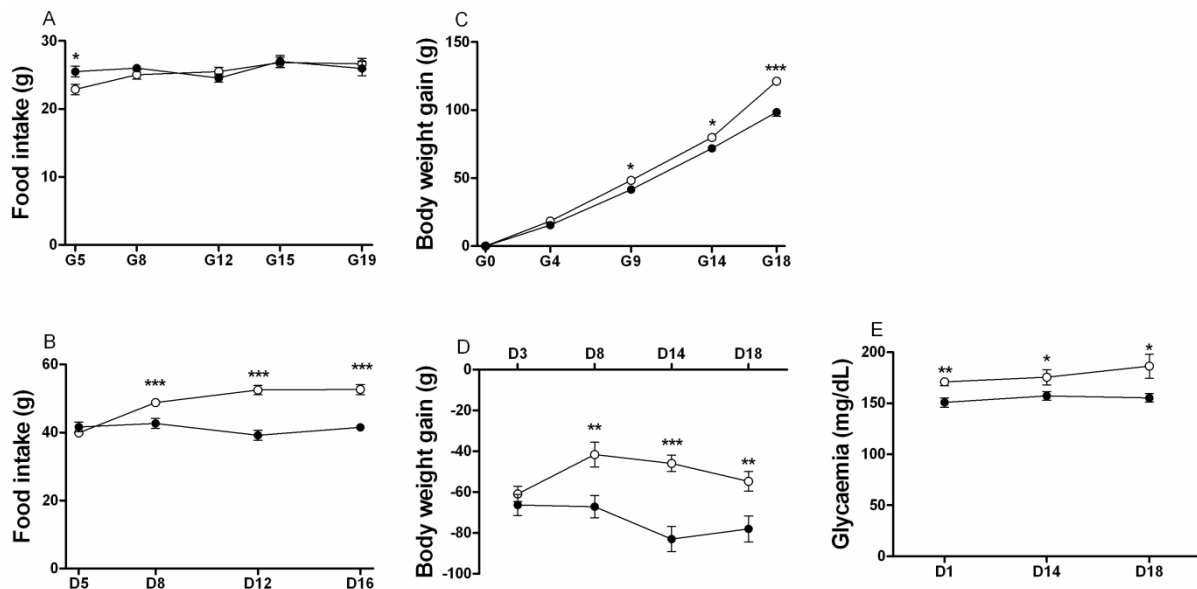


Figure 2. Dams daily food intake (A: gestation-B: lactation), body weight gain (C: gestation-D: lactation) from G1 to G18 during gestation period and from D1 to D18 during lactation period and dams glycaemia (E) from D1 to D18 during lactation period.

G: gestational day; D: postnatal day. White circles, control diet fed dams (n=10-16); Black circles, protein-restricted diet fed dams (n=10-16). During gestation, body weight gain (BWG) was assessed as the difference between the body weight (BW) at the time of the measurement and the body weight of the day of confirmation of mating. During suckling period, BWG was calculated as the difference between the BW of the day of measurement and the BW assessed after delivery. Values are means $\pm$ SEM. *, **, *** C vs R, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$ respectively and at one day of sampling.

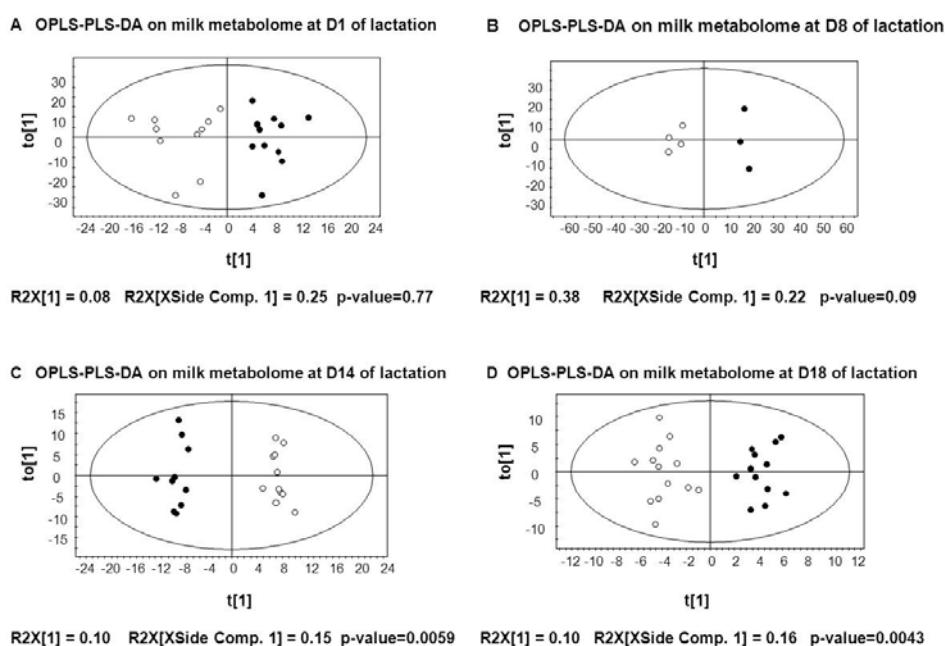
Maternal protein restriction during gestation and lactation modulates milk composition

Measurements on milk composition were presented as a comparison between dams milk depending on their diet (control or protein-restricted diet) since no influences from the pups that they nursed were found on milk composition.

Maternal perinatal protein restriction modulates the milk metabolomic signature and macronutrient composition throughout lactation

The perinatal maternal diet-related effects on milk metabolome were evaluated via OPLS-DA comparisons of the LC-HRMS profiles performed from the milk samples of dams fed a normal or a low-protein diet collected at different stages of lactation (D : 1, 9, 14 and 18). A distinguishable separation between R and C milk in the first predictive component of cross-validated OPLS-DA score plots (illustrated in Figures 3A, 3B, 3C, 3D) is apparent essentially from 14 days of lactation, even if statistically significant model indicators (R^2 (X) and Q^2 values) were obtained. Around 780 mass spectrometric descriptors (ions characterized by a given retention time and molecular weight) were detected in metabolomic fingerprints generated from analysed milk sample at each kinetic time point. However, as basically achieved in this type of study, only a limited fraction of metabolites could be annotated with our homemade data bank (Table S2). Among the metabolites of interest, higher carnitine and betaine levels were observed throughout lactation in R milk. Nicotinamide levels were also found increased in R milk compared with C milk but only until D14.

The targeted analyses of milk macronutrients content showed that total milk fatty acids content was higher in R than C milk but decreased throughout lactation for both group of dams (Figure 3F). However, despite the protein restriction, R and C dams had comparable levels of protein in their milk, except at D14 where the protein concentration was found significantly lower in R milk than C milk (Figure 3E). The lactose concentration levels were alternatively higher at D9 and lower at D18 in R dams milk than C one (Figure 3G)



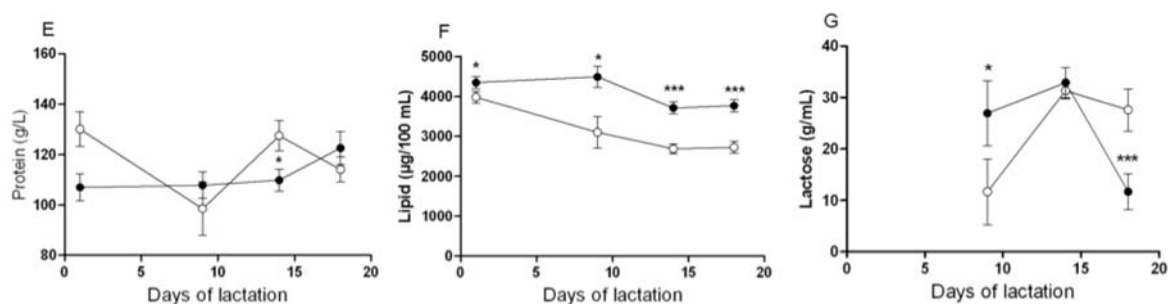


Figure 3. Milk metabolomic signatures observed at different stages of lactation: D1 (3A), D9 (3B), D14 (3C), and D18 (3D); and milk composition in macronutrients throughout lactation: protein (3E), total fatty acids (3F), and lactose (3G).

For 3A, 3B, and 3C, OPLS-DA score plot, one predictive and one orthogonal component for D1 and D9 of lactation, one predictive and two orthogonal components for D14 and D18 of lactation. Values for $R^2(X)$, $R^2(Y)$ and Q^2 were respectively: 0.332-0.801-0.099 (3A) ; 0.604-0.976-0.684 (3B) ; 0.415-0.977-0.661 (3C) ; 0.461-0.913-0.615 (3D). For 3E, 3F, and 3G, data are means $\pm$ SEM. White circles for C milk (n=10-13); Black circles for R milk (n=10-14). *, **, *** C vs R, $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively.

Perinatal maternal protein restriction alters milk free amino acids (FAA) patterns

Our results indicate clearly that a perinatal maternal protein restriction induces a significant decrease of most free amino acids levels in milk, noticeable only at the end of lactation (D18) compared with control dams milk (Table 1). Then, the ratio between essential (or conditionally essential in humans) versus no essential free amino acids was lower in R along the all lactation (Figure 4A) with a clear decrease in proline and threonine levels, the latter being more marked (Table 1). Conversely, some free amino acids appeared transitorily significantly increased at D14, such as alanine, asparagine/aspartic acid, serine and glycine. While sulfur amino acids (sum of methionine, taurine, and cysteine–homocysteine was not determined) were significantly high in both dams milk at D1 compared with the other periods, concentrations were higher in C than R milk at D9 and D18 (Figure 4B). Finally the sum of amino acids involved in glycemic and insulinemic response (i.e. valine+leucine+isoleucine+lysine+threonine+arginine)^{34,35} stayed even along the all lactation in C milk whereas was significantly lower in R milk (Figure 4C).

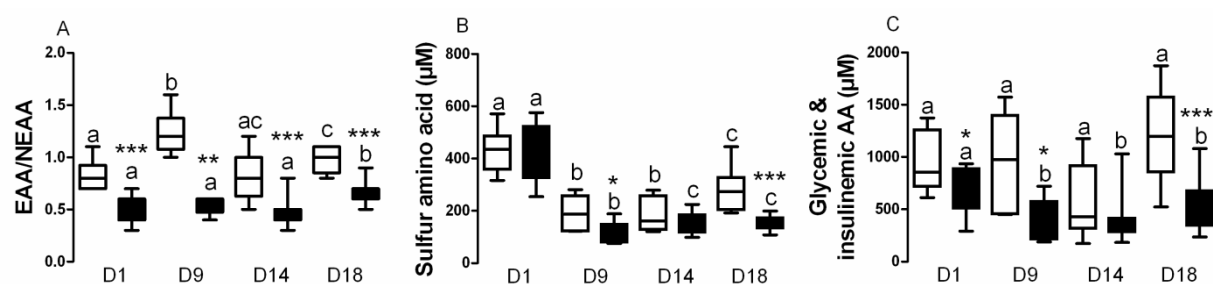


Figure 4. Milk EAA/NEAA (A), sulfur amino acids (B), and glycemic as insulinemic amino acids (C) at different stages of lactation.

EAA: essential amino acid; NEAA: non essential amino acid. AA: amino acid.

Insulinemic and glycemic amino acids= valine +leucine+isoleucine+ threonine+lysine+arginine ^{34,35}. Sulfur Amino Acids (SAA): taurine, cysteine/cystine, and methionine.

Data are medians [min-max]. White boxes, milk C. Black boxes, milk R.

*, **, *** C vs R, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$ respectively and at one day of sampling.

Means with different letters are significantly different at 1% for one group of dams and throughout lactation.

Perinatal maternal protein restriction increases milk content in fatty acids

Saturated fatty acids were maintained at stable levels throughout lactation in C milk whereas concentrations increased in R milk and were more elevated in R milk from D9 to D18 (Figure 5A). Among these saturated species, the long-chain palmitic acid (C16:0) and stearic (C18:0) acid were increased. Monounsaturated and polyunsaturated fatty acids were at higher levels in R milk than in C one from D9 to D18 and from D14 to D18, respectively although both milk presented decreasing levels throughout the suckling period (Figures 5B and 5C, respectively). At D1 and D14, transitory increased levels in total n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids content resulting in higher n-6/n-3 PUFA ratio (Figure 5D) were observed in R milk compared with C milk associated with increased ratios of oleic acid/PUFA (Figure 5E) and of γ -linolenic acid/ α linoleic acid in R milk from D9 (Figure 5F) in higher extend in R than in C milk all along the suckling period. Precisely, the precursor of the omega 6 the linoleic acid (cis C18:2 n-6 namely LA, statistically significant at D14 only) and its derivate the γ -linolenic acid (cis C18:3 n-6 namely GLA) as well as the arachidonic acid (cis C20:4 n-6 namely AA) were at higher concentrations in R milk than in C milk all along the lactation, except at D1 for the arachidonic acid, (Table 3). A similar pattern was observed in R milk for the precursor of the omega 3 the linolenic acid (cis C 18:3 n-3 namely ALA) and its derivate, the eicosapentaenoic acid (cis C20:5 n-3 namely EPA) and the docosapentaenoic acid (cis C22:5 n-3 namely DPA).

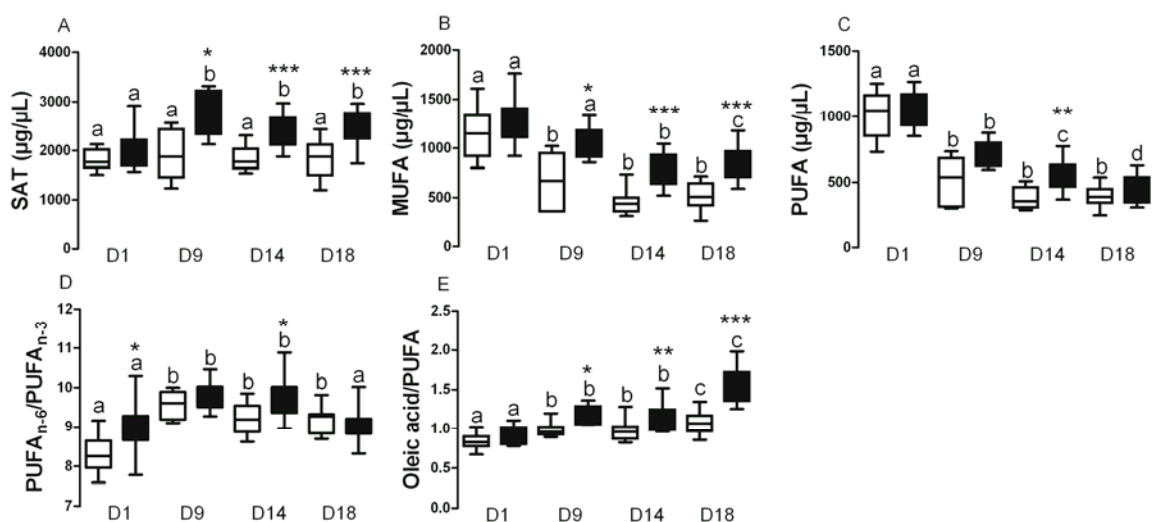


Figure 5. Concentration levels of total saturated (A), monounsaturated (B), and polyunsaturated (C) fatty acids, as well as PUFA_{n-6}/PUFA_{n-3} (D) and Oleic acid/PUFA (E) ratio measured in milk at different stages of lactation.

SAT: saturated; MUFA: monounsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid.

Data are medians [min-max]. White boxes, milk C. Black boxes, milk R.

*, **, *** C vs R, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$ respectively and at one day of sampling.

Means with different letters are significantly different at 1% for one group of dams and throughout lactation.

Table 1. Concentration levels (μM) of free amino acids measured in milk at D1, D9, D14 and D18 of lactation from C and R dams.

Free amino acids (μM)	D1		D9		D14		D18	
	Milk C (n=10)	Milk R (n=11)	Milk C (n=6)	Milk R (n=6)	Milk C (n=12)	Milk R (n=11)	Milk C (n=13)	Milk R (n=11)
EAA	109.5 $\pm$ 9.22	68.06 $\pm$ 6.93**	122.2 $\pm$ 21.26	55.6 $\pm$ 12.72*	90.3 $\pm$ 12.10	68.4 $\pm$ 10.81	172.3 $\pm$ 13.29	75.8 $\pm$ 6.92***
Histidine	28.0 $\pm$ 2.4	28.3 $\pm$ 2.6	26.4 $\pm$ 5.4	22.8 $\pm$ 4.8	24.0 $\pm$ 3.8	30.7 $\pm$ 3.9	46.4 $\pm$ 5.6	31.7 $\pm$ 4.4
Arginine	366.0 $\pm$ 19.8	345.6 $\pm$ 27.7	248.9 $\pm$ 41.9	138.5 $\pm$ 15.8	36.0 $\pm$ 5.87	25.7 $\pm$ 3.19	314.7 $\pm$ 35.6	177.7 $\pm$ 24.6*
Isoleucine	17.7 $\pm$ 1.93	12.0 $\pm$ 2.29*	11.3 $\pm$ 3.19	6.17 $\pm$ 2.54	17.3 $\pm$ 3.33	14.4 $\pm$ 1.78	28.6 $\pm$ 3.95	11.7 $\pm$ 2.51**
Leucine	39.8 $\pm$ 3.73	28.8 $\pm$ 5.10	28.3 $\pm$ 5.96	9.83 $\pm$ 2.15*	32.9 $\pm$ 6.11	18.8 $\pm$ 2.19	64.5 $\pm$ 7.82	28.5 $\pm$ 5.52**
Proline	216.7 $\pm$ 16.5	128.9 $\pm$ 11.1**	270.2 $\pm$ 29.2	142.0 $\pm$ 38.1*	315.3 $\pm$ 35.1	224.1 $\pm$ 32.1*	467.2 $\pm$ 23.9	274.3 $\pm$ 20.9***
Lysine	272.5 $\pm$ 52.0	187.2 $\pm$ 22.5	322.3 $\pm$ 76.5	171.6 $\pm$ 59.3	229.4 $\pm$ 52.0	284.0 $\pm$ 65.3	357.7 $\pm$ 42.6	218.4 $\pm$ 31.3*
Methionine	21.6 $\pm$ 3.26	8.1 $\pm$ 2.0**	4.50 $\pm$ 8.19	14.2 $\pm$ 6.59	48.5 $\pm$ 6.35	38.7 $\pm$ 4.47	74.7 $\pm$ 7.32	43.5 $\pm$ 5.12**
Phenylalanine	23.0 $\pm$ 2.50	19.4 $\pm$ 2.56	21.2 $\pm$ 4.87	12.0 $\pm$ 2.63	22.8 $\pm$ 3.09	20.9 $\pm$ 1.77	50.7 $\pm$ 7.53	21.8 $\pm$ 4.05**
Threonine	199.0 $\pm$ 22.3	37.2 $\pm$ 11.0 ***	286.9 $\pm$ 58.2	< 1.5***	190.8 $\pm$ 24.3	34.6 $\pm$ 5.14***	341.7 $\pm$ 27.0	25.4 $\pm$ 9.36***
Tryptophan	16.3 $\pm$ 1.54	13.8 $\pm$ 1.74	18.8 $\pm$ 3.58	14.3 $\pm$ 2.68	18.6 $\pm$ 2.98	19.5 $\pm$ 1.77	34.7 $\pm$ 3.41	18.8 $\pm$ 1.92**
Valine	64.5 $\pm$ 5.42	37.0 $\pm$ 4.86**	65.2 $\pm$ 12.0	39.3 $\pm$ 11.6	63.6 $\pm$ 11.8	53.71 $\pm$ 7.51	114.0 $\pm$ 11.4	58.4 $\pm$ 8.60**
NEAA	138.0 $\pm$ 8.34	130.7 $\pm$ 10.4	107.7 $\pm$ 15.05	101.4 $\pm$ 20.59	116.2 $\pm$ 9.82	152.0 $\pm$ 13.0 *	204.5 $\pm$ 15.53	127.0 $\pm$ 10.33**
Alanine	430.0 $\pm$ 47.3	433.9 $\pm$ 28.3	445.7 $\pm$ 73.2	443.8 $\pm$ 154.3	452.1 $\pm$ 54.8	657.4 $\pm$ 74.8*	783.6 $\pm$ 66.6	517.0 $\pm$ 53.2**
Aspartic acid & asparagine	80.6 $\pm$ 14.2	77.1 $\pm$ 9.12	56.1 $\pm$ 7.00	90.2 $\pm$ 7.10 **	101.8 $\pm$ 7.51	131.3 $\pm$ 9.55*	203.7 $\pm$ 18.6	121.4 $\pm$ 10.7**
Glutamine	41.3 $\pm$ 4.70	21.4 $\pm$ 5.21*	16.4 $\pm$ 8.64	7.33 $\pm$ 2.16	62.7 $\pm$ 13.0	71.2 $\pm$ 10.4	74.5 $\pm$ 17.7	24.6 $\pm$ 7.74*
Glutamic acid	147.9 $\pm$ 14.3	143.9 $\pm$ 15.4	100.0 $\pm$ 13.1	93.8 $\pm$ 14.0	110.8 $\pm$ 5.59	123.7 $\pm$ 8.41	200.5 $\pm$ 16.1	112.3 $\pm$ 14.8**
Glx	189.3 $\pm$ 13.3	155.2 $\pm$ 14.5	116.2 $\pm$ 20.0	100.6 $\pm$ 13.1	173.5 $\pm$ 16.3	185.3 $\pm$ 16.0	274.9 $\pm$ 31.9	132.1 $\pm$ 19.3**
Cysteine/ Cystine	33.1 $\pm$ 3.31	26.5 $\pm$ 3.90	26.8 $\pm$ 5.40	7.87 $\pm$ 2.12*	14.4 $\pm$ 3.71	7.39 $\pm$ 2.29	34.8 $\pm$ 6.05	8.28 $\pm$ 1.77**
Glycine	164.8 $\pm$ 13.3	242.6 $\pm$ 17.6 **	119.5 $\pm$ 16.0	173.7 $\pm$ 31.0	82.7 $\pm$ 6.35	214 $\pm$ 14.7 ***	167.6 $\pm$ 23.1	149.5 $\pm$ 16.5
Serine	150.7 $\pm$ 17.4	180.3 $\pm$ 17.8	130.8 $\pm$ 19.7	155.5 $\pm$ 31.4	122.3 $\pm$ 12.2	202.6 $\pm$ 18.2 **	246.2 $\pm$ 21.4	198.4 $\pm$ 23.6
Tyrosine	32.6 $\pm$ 4.13	25.7 $\pm$ 3.68	46.7 $\pm$ 11.1	28.9 $\pm$ 7.74	40.4 $\pm$ 6.20	45.7 $\pm$ 4.12	72.6 $\pm$ 6.45	54.4 $\pm$ 7.58*
Citrulline	17.6 $\pm$ 3.14	14.3 $\pm$ 2.06	14.8 $\pm$ 5.01	12.1 $\pm$ 5.06	20.8 $\pm$ 4.62	28.6 $\pm$ 5.82	42.7 $\pm$ 4.64	31.4 $\pm$ 5.86
Taurine	372.3 $\pm$ 30.1	377.2 $\pm$ 36.1	120.0 $\pm$ 16.1	86.4 $\pm$ 11.9	123.5 $\pm$ 8.7	107.0 $\pm$ 7.5	169.7 $\pm$ 8.5	104.0 $\pm$ 9.2**
Total FAA	2552 $\pm$ 193	2099 $\pm$ 193	2421 $\pm$ 382	1573 $\pm$ 359	2131 $\pm$ 240	2302 $\pm$ 217	3891 $\pm$ 301	2094 $\pm$ 182 **

Results are expressed as mean $\pm$ SEM

EAA: Essential Amino Acids; NEAA: Non-Essential Amino Acids; FAA: Free Amino Acid; Glx: glutamine + glutamic acid

*, **, *** C vs R, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$ respectively.

Table 3. Concentration levels ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) of fatty acids measured in milk at D1, D9, D14 and D18 of lactation from C and R dams.

Fatty acids ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)	D1		D9		D 14		D 18	
	Milk C (n=10)	Milk R (n=13)	Milk C (n=6)	Milk R (n=6)	Milk C (n=12)	Milk R (n=14)	Milk C (n=13)	Milk R (n=13)
8:0	142.3 $\pm$ 12.5	143.5 $\pm$ 13.1	127.2 $\pm$ 26.6	162.7 $\pm$ 13.8	129.0 $\pm$ 9.7	177.3 $\pm$ 11.2 **	184.3 $\pm$ 11.7	219.8 $\pm$ 11.8*
10:0	294.9 $\pm$ 35.6	301.3 $\pm$ 41.3	373.3 $\pm$ 62.0	448.8 $\pm$ 37.5	393.8 $\pm$ 22.4	539.0 $\pm$ 39.6 **	492.7 $\pm$ 26.4	583.1 $\pm$ 28.7
12:0	155.7 $\pm$ 22.6	165.0 $\pm$ 25.5	311.0 $\pm$ 41.9	354.9 $\pm$ 24.5	327.8 $\pm$ 16.8	408.3 $\pm$ 15.7**	320.4 $\pm$ 22.0	393.2 $\pm$ 21.7*
14:0	108.9 $\pm$ 11.9	127.1 $\pm$ 15.6	292.3 $\pm$ 33.1	348.8 $\pm$ 18.6	310.5 $\pm$ 17.0	382.4 $\pm$ 13.9**	240.2 $\pm$ 22.5	323.1 $\pm$ 22.2 *
16:0	847.7 $\pm$ 56.2	971.1 $\pm$ 49.8	655.3 $\pm$ 47.9	1063 $\pm$ 67.7**	605.1 $\pm$ 26.7	807.8 $\pm$ 27.2 **	486.7 $\pm$ 29.6	825.8 $\pm$ 45.6 ***
18:0	255.9 $\pm$ 20.6	296.2 $\pm$ 29.0	114.7 $\pm$ 13.5	237.0 $\pm$ 36.0 **	79.5 $\pm$ 34.0	114.8 $\pm$ 7.6***	75.7 $\pm$ 3.8	134.0 $\pm$ 11.5 ***
20:0	6.8 $\pm$ 05	4.9 $\pm$ 0.2***	4.7 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.2 **	2.5 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.2 **
22:0	3.5 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2***	1.8 $\pm$ 0.2	1.98 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1***	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1
16:1 _{n-9}	15.7 $\pm$ 2.5	13.1 $\pm$ 1.6	8.8 $\pm$ 1.6	12.3 $\pm$ 1.7	5.8 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 0.7***	6.5 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 0.8***
16:1 _{n-7}	148.1 $\pm$ 13.	187.4 $\pm$ 12.6	63.7 $\pm$ 17.7	128.3 $\pm$ 13.1 *	37.5 $\pm$ 3.8	75.3 $\pm$ 5.1 ***	45.0 $\pm$ 4.6	103.6 $\pm$ 10.1***
18:1 _{n-9}	851.6 $\pm$ 55.3	964.4 $\pm$ 44.4*	532.1 $\pm$ 110.5	876.7 $\pm$ 63.8	376.1 $\pm$ 28.8	595.4 $\pm$ 35.0***	414.1 $\pm$ 29.1	666.6 $\pm$ 35.9 ***
18:1 _{n-7}	98.2 $\pm$ 8.5	89.2 $\pm$ 6.2	58.1 $\pm$ 10.2	74.2 $\pm$ 4.7	36.4 $\pm$ 3.2	48.1 $\pm$ 1.9**	37.0 $\pm$ 2.6	44.8 $\pm$ 2.0*
20:1 _{n-9}	25.6 $\pm$ 2.2	20.7 $\pm$ 1.8	13.3 $\pm$ 3.1	20.8 $\pm$ 3.7	6.9 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 0.9	6.5 $\pm$ 0.5	8.4 $\pm$ 0.6 *
22:1 _{n-9}	2.0 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.05	0.4 $\pm$ 0.07	0.5 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.07
<i>trans</i> 18:2 _{n-6}	8.1 $\pm$ 0.8	8.0 $\pm$ 0.8	3.4 $\pm$ 1.5	7.2 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.5*	1.3 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.7 ***
<i>cis</i> 18:2 _{n-6} (LA)	608.5 $\pm$ 28.5	688.9 $\pm$ 27.2	382.6 $\pm$ 60.2	515.3 $\pm$ 43.6	301.0 $\pm$ 17.5	409.0 $\pm$ 26.9*	310.3 $\pm$ 17.9	343.1 $\pm$ 26.7
<i>cis</i> 18:3 _{n-6} (GLA)	23.6 $\pm$ 2.1	37.9 $\pm$ 3.3**	4.4 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 0.9 **	3.0 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.6 ***	2.2 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.5 ***
<i>cis</i> 20:2 _{n-6}	33.2 $\pm$ 1.9	26.4 $\pm$ 1.9	22.7 $\pm$ 4.1	26.7 $\pm$ 4.2	12.7 $\pm$ 1.0	12.6 $\pm$ 1.2	10.0 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 0.8
<i>cis</i> 20:3 _{n-6}	26.9 $\pm$ 1.7	28.9 $\pm$ 1.1	14.9 $\pm$ 1.9	22.0 $\pm$ 2.3*	12.4 $\pm$ 0.9	12.2 $\pm$ 1.0	4.4 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.7**
<i>cis</i> 20:4 _{n-6} (AA)	122.1 $\pm$ 13.2	112.8 $\pm$ 4.7	24.3 $\pm$ 3.3	37.6 $\pm$ 4.2 **	13.6 $\pm$ 1.3	24.5 $\pm$ 1.8**	12.9 $\pm$ 0.6	19.5 $\pm$ 1.8 **
<i>cis</i> 22:2 _{n-6}	10.8 $\pm$ 7.9	2.4 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.04	1.1 $\pm$ 0.3 **	0.9 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.05 **
<i>cis</i> 22:4 _{n-6}	51.5 $\pm$ 8.6	36.4 $\pm$ 4.5	9.8 $\pm$ 1.8	12.0 $\pm$ 1.4	5.06 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 0.5*
Total n-6 PUFA	905 $\pm$ 49	956 $\pm$ 34	466 $\pm$ 72	638 $\pm$ 39	345 $\pm$ 20	477 $\pm$ 31 **	347 $\pm$ 19	396 $\pm$ 27
<i>cis</i> 18:3 _{n-3} (ALA)	39.8 $\pm$ 2.8	43.0 $\pm$ 1.9	29.7 $\pm$ 4.9	39.4 $\pm$ 3.7	26.5 $\pm$ 1.4	32.0 $\pm$ 1.9*	27.5 $\pm$ 1.7	28.3 $\pm$ 2.1
<i>cis</i> 20:3 _{n-3}	3.5 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.3 *	0.9 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
<i>cis</i> 20:5 _{n-3} (EPA)	12.1 $\pm$ 1.0	13.3 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.4 *	2.3 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.2 ***	1.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.2 ***
<i>cis</i> 22:5 _{n-3} (DPA)	19.4 $\pm$ 2.1	15.4 $\pm$ 1.2	4.2 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 0.6 *	2.8 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.3 ***	2.0 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2 ***
<i>cis</i> 22:6 _{n-3} (DHA)	28.6 $\pm$ 2.4	24.6 $\pm$ 1.4	7.9 $\pm$ 1.3	8.1 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.3
Total n-3 PUFA	109 $\pm$ 7	107 $\pm$ 3	49 $\pm$ 7	65 $\pm$ 5	37 $\pm$ 2	49 $\pm$ 3*	37 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2

PUFA: Polyunsaturated fatty acid; AA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexanoic acid; GLNA : γ -linolenic acid ; LA: Linoleic acid; ALNA: α -Linolenic acid. Results are expressed as mean $\pm$ SEM and are given for fatty acids present at $> 0.05\%$ of total fatty acids in milk. *, **, *** C vs R, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively.

Offspring growth after weaning and insulin levels trajectory during lactation

Low protein intake during gestation led to an intra-uterine growth restriction of the offspring, reflected by pups lower body weight at birth as previously shown²³. At D25, pups, suckled by C dams (CC and RC), had a heavier brain, liver, heart, kidney, and a larger relative adipose tissue and relative body weight gain whatever their birth weight when compared with RR and CR pups suckled by R dams (Table 3). RC pups rats caught up growth at D6 and at D25 they had similar organs weight than CC pups but a higher relative body weight gain (Table 3). These differences observed in organ growth in weaned offspring were associated to specific postnatal insulin trajectory during suckling period according to maternal diet. Pups suckled by C dams (CC and RC) showed an insulin surge at D5 (Figure 6) whereas RR presented low and stable insulin levels through the suckling period, as observed in CR pups at the two time points available. From D16 to D20, RC presented higher insulin than CC and both group of pups nursed by R dams (Figure 6).

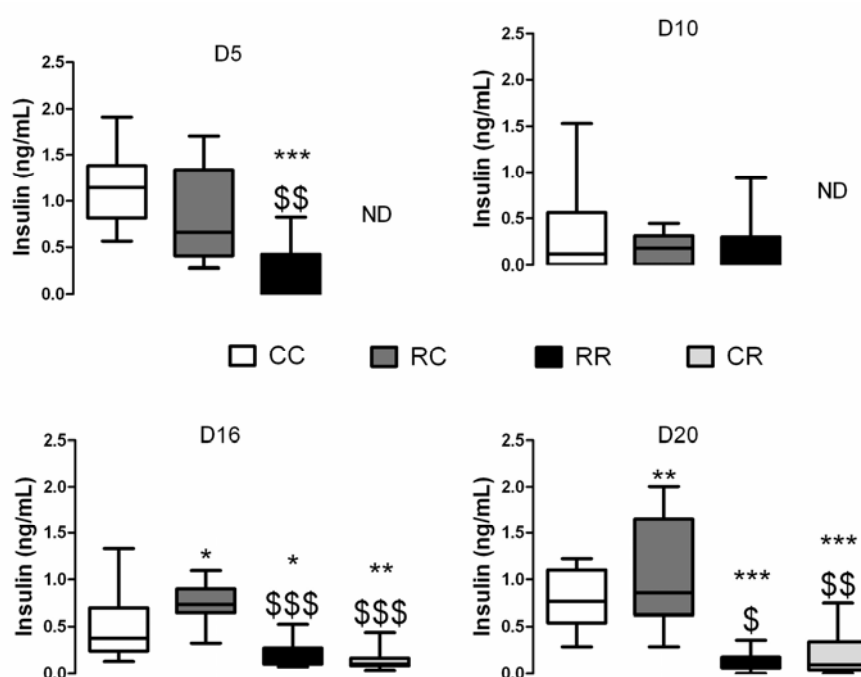


Figure 6. Insulin concentration levels (ng/mL) measured in plasma of CC (10), RC (10), CR (8) and RR (10) male offspring from birth to postnatal day 20.

Values are medians [min-max]. *, **, *** *vs* CC offspring, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively; \$, \$\$, \$\$\$ *vs* RC offspring, $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively.

Table 1. Organ weights, relative body weight gain and relative adiposity of male offspring of 25 days male.

	Relative BWG					
	(%)	Adiposity (%)	Brain (g)	Liver (g)	Heart (g)	Kidneys (g)
CC	967 ± 20	1.28 ± 0.06	1.59 ± 0.02	3.81 ± 0.13	0.57 ± 0.02	1.04 ± 0.03
RC	1059 ± 18*	1.30 ± 0.05	1.55 ± 0.03	3.58 ± 0.08	0.60 ± 0.01	0.98 ± 0.03
RR	665 ± 37*\$	1.06 ± 0.04*\$#	1.37 ± 0.03*\$	2.23 ± 0.11*\$	0.37 ± 0.01*\$	0.66 ± 0.04*\$
CR	548 ± 27*\$	0.89 ± 0.06*\$	1.38 ± 0.02*\$	2.08 ± 0.09*\$	0.35 ± 0.01*\$	0.63 ± 0.02*\$

Values are means ± SEM

Relative BWG was assessed as the ratio between the body weight (BW) at the time of the measurement (25 days) and the body weight at birth.

% adiposity was assessed as relative total visceral white adipose tissue mass to total body weight

For pups: * vs CC offspring, p<0.01; \$ vs RC offspring, p<0.01; # vs CR offspring, p<0.01.

Discussion

There is a major gap in our understanding of the tight relationship between maternal nutrition during the perinatal period, milk composition and permanent metabolic changes observed in offspring that might enhance disease susceptibility^{36,37}. Indeed, scarce available studies conducted in low-protein fed rodent models at various interventional time-windows showed contradictory results with regard to milk macronutrients composition³⁸⁻⁴⁰. To our current knowledge, this present study is the first to explore the impact of maintained maternal protein restriction throughout gestation and lactation on dams milk composition. Milk has been studied in its extensive complexity through metabolomics and targeted free amino acid and fatty acids analysis in order to have a comprehensive picture of the variations along the all lactation period. In the discussion, we will focus several free amino acids and/or fatty acids known to be involved in pancreatic insulin secretion and insulin sensitivity as well as in oxidative stress and inflammation⁴¹.

Maternal protein restriction preserved protein but increased drastically fat content in milk

Our results confirm that severe reduction in protein content of the diet offered to dams during gestation and lactation has minor effect on maternal physiological status during gestation^{42,43}, but can drastically impair maternal food intake and growth during lactation

compared to control dams similarly to maternal protein restriction occurring only during lactation ^{40,44}. Despite this element and in addition to the lower levels of protein contained in the diet, the protein content in milk from dams submitted to severe protein restriction during all the perinatal time-window appeared to be preserved, similarly to that of our control dams, but contrasting with the immediate fall in milk protein content reported in one similar study ³⁹ and in dams fed low-protein diet only during lactation ^{40,44,45}. Additionally, at a macroscopic level, protein-restricted dams delivered milk that presented an immediate high fat concentration from the first day of lactation to the end as already observed by others. This finding occurred independently of the perinatal time-window where protein restriction has been inflicted to the dams ³⁸⁻⁴⁰.

Altogether these findings suggest the existence of a metabolic adaptation in protein-restricted females in order to dispose of high-energy milk to encounter the unbalanced supply of protein derived from dietary ⁴⁰. These differences in milk composition according to the perinatal time-window period of protein restriction could be the result of a mammary gland adaptation ⁴⁶. It is likely that dams under protein restriction mobilized a part of their endogenous reserves through a higher proteolysis of their muscle mass to sustain milk protein content ^{40,47} as suggested by the dramatic body weight loss observed in the R lactating dams. On the other hand, the rise in milk fatty acids could be in agreement with mammary glands lipogenesis that reportedly occurs during lactation ^{4,48,49}. This may lead to an increase in fatty acids mobilization from the mammary glands and probably from adipose tissue and liver, as perinatal maternal protein restriction was shown to induce an increase in liver mass and its lipid content leading to a “fatty liver” phenotype in dams ^{43,48}. Moreover, the particular increase in three polyunsaturated long-chain fatty acids (AA, EPA and DHA) in R milk, as soon as D9 of lactation, argued more in favor of an up-regulation of the activity of the enzymes involved in their formation, as the mammary gland mRNA expression of delta-6 and delta-5 desaturases and elongase 5 was recently shown to be decreased in pregnant low-protein restricted dams ⁵⁰ beside unchanged protein levels. The fall in lactose concentration found in R dams milk concomitant to the dams lower glycaemia could be induced by a substantial depletion of maternal endogenous gluconeogenic amino acids at the end of lactation, combined with an increase in mammary glands requirement in glucose for lipogenesis ⁵¹ rather than for lactose synthesis.

Our findings are in agreement with the lack of effect of malnutrition on human milk protein content reported in under-nourished mothers in developing country as Gambia compared with well-nourished British mothers ^{52,53}. However it contrasts with the reported low fat content and the unchanged lactose levels found in breast milk in malnourished mothers ⁵². It is likely that drastic food restriction maintained along the all life in these communities induce other specific metabolic adaptations during the pre-pubertal and puberty period. These adaptations could account for adverse effects on breast milk synthesis and composition ^{46,54}.

Milk trophic effect driven by maternal diet is determinant in postnatal offspring growth

The higher energy density mainly due to increased fat in R milk was associated with lower relative adipose tissue and body weight gain for the pups nursed by protein-restricted dams than pups suckled by control dams. This lower development could be due to the lower content of most FAA observed in R milk, as FAA is a source of readily available nitrogen necessary for the dramatic growth of the suckled neonates ⁵⁵. Effectively, a strong reduction in the free essential /no essential amino acids ratio was observed in R milk along the all lactation period. The same was observed for proline, whose requirement for whole-body protein synthesis is the highest among amino acids, leucine, which activates mammalian target rapamycin to stimulate protein synthesis and inhibit proteolysis and particularly threonine, known to maintain whole-body protein balance ⁵⁶. Furthermore, we found low levels of insulinemic and glycemic free amino acids in R milk throughout lactation combined with lower plasma insulin levels throughout lactation period in pups nursed by R dams as compared with pups nursed by C dams. Besides, a fall was observed at the end of lactation in taurine levels, a non-protein amino acid shown to have stimulatory effect on insulin secretion by pancreatic islets ⁵⁷. Altogether, our data tend to indicate that perinatal protein-restricted dams milk presents a lower insulinotropic effect ⁵⁸ due to its free amino acids composition, and may account greatly for the reduction in body and organs weights observed in the weaned pups. Moreover, it can be hypothesized that this milk depletion in insulinemic and glycemic free amino acids could result from the period of gestation as branched-chain amino acids (i.e. valine, leucine, isoleucine) and threonine were previously reported to be decreased at 19 days of gestation in the plasma of protein-restricted dams ⁵⁹. As comparison, in one of the scarce study investigating FAA composition in human milk provided by mothers of small-for-gestational-age infant, valine and lysine levels were shown increased as compared with the

FAA contained in milk from mothers of appropriate-for-gestational-age infants ⁶⁰. To our knowledge, no data concerning the FAA levels in under-nourished mothers are available, at the exception, of constant non-protein nitrogenous substances (including urea) that was reported throughout the all lactation ⁹. The magnitude of the fall in threonine is striking and may be linked to its conversion in ketobutyric acid and glycine, as previously suggested in mother and foetuses of a low-protein rat model ⁵⁹. In agreement with this, glycine, a precursor of purine bases required for growth and intestinal maturation ⁶¹, is one of the scarce free amino acids for which we observed a transiently increase of its content in R milk beside higher levels of nicotinamide but only during the first middle of lactation.

Milk production was not measured in the present study due to the lack of convenient methods, but it cannot be excluded that the lower growth observed in pups suckled by R dams could be attributed to a diminished milk yield as previously observed in rodent model of protein ⁴³ or energy ⁶² restriction. Finally, an insufficient protein supply in quality should also be considered as only milk whey-protein concentration was shown to be reduced in protein restriction during established lactation ^{38,63}.

Perinatal maternal protein restriction impacts milk redox and inflammatory status associated with favoring β -oxidation compounds

Perinatal protein-restricted dams presented differences in milk oxidative status as reflected by the pattern of some free amino acids involved in sulfur and glutathione metabolism as well as by other metabolites contributing to both metabolic pathways. All along the lactation, R milk presented higher betaine levels while methionine concentrations were decreased. This could suggest lower methylation of homocysteine by betaine to form methionine ⁶⁴ what would consequently allow bioavailability of homocysteine to produce cysteine once trans-sulfurated with serine. Despite that serine levels were at similar or higher levels in R than C milk, we found lower levels of cysteine, a limiting amino acid in glutathione synthesis. The two other limiting amino acids of glutathione synthesis (glutamic acid and glycine) were also found at similar or even higher levels in R than C milk. These findings might underlie alteration in glutathione synthesis in R milk through a cysteine-limiting step and , combined with a fall in tryptophan, another powerful free radical scavenger present in human milk ⁶⁵, suggests variations in antioxidant status of the dams milk that is probably the reflect of the protein-restricted mothers status.

On the other hand, milk qualitative fat content was found modified by maternal protein restriction with an increase of most fatty acids. In details, higher levels in saturated, monounsaturated and in several polyunsaturated long-chain fatty acids were measured in R milk, as soon as D9 of lactation. In particular, the high amount of monounsaturated fatty acid and arachidonic acid may be responsible of the induction of oxidative stress by production of free radicals and secondary peroxidation byproducts^{66,67}. Yet a higher ratio of oleic acid/PUFA was observed in R milk that have been associated to reduce oxidative stress^{41,68}. Although, we could not conclude to the milk oxidant status, the findings regarding fatty acids composition associated with the above description of the free amino acids contained in R milk seems to be more in favor of an altered redox status of this milk. In addition to variation in components involved in redox status, a rise in n-6/n-3 PUFA ratio was observed as well as in arachidonic acid in R milk what can be of importance since this molecule play crucial role in inflammation, where arachidonic acid is the precursor of eicosanoids, leukotrienes and prostaglandines, that are mediators of inflammation⁶⁹.

Additionally, higher EPA content was found in R milk. In a previous work we found higher whole body insulin sensitivity in adult male rats that were nursed by protein-restricted dams as compared to the one that were suckled by control dams, independently of the *in utero* maternal protein diet (Martin Agnoux A et al, *unpublished results*). These two elements could highlight the debate on the recent evidence suggesting that EPA might help to delay the progression of metabolic syndrome and type 2 diabetes⁷⁰ by improvement of insulin sensitivity and muscle fatty acids β -oxidation⁷¹. Moreover higher levels in carnitine, a key metabolite in long-chain fatty acids β -oxidation, were found in R milk throughout lactation. This increased dietary carnitine availability for pups could reinforced this hypothesis since pups suckled by protein-restricted dams had higher carnitine levels than pups suckled by C dams and could extensively contribute to the carnitine status of the adult offspring previously described²⁸ (Martin Agnoux A et al, *unpublished results*).

In conclusion, our data indicate that maternal nutritional status during both gestation and lactation period could have short-time consequences on newborn growth that could participate to the adult metabolic outcomes observed in perinatal programming. In milk, a decrease in several free amino acids and an increase in most fatty acids could reflect alterations in whole-body homeostasis of protein-restricted dams. It will lead to lower insulin circulating levels in suckled offspring that could then have lasting effects in pups

development and adult metabolic programming. Altogether, these results open new perspectives to optimize milk composition by acting on maternal nutrition.

Acknowledgments

The authors thank Anne Meynier (BIA, INRA, Nantes, France) for her expertise in fatty acids analysis and her attentive review of the manuscript. The authors also acknowledge Frédérique Courant and Anne-Lise Royer (LABERCA, Oniris, Nantes, France) for standard characterization in LCMS method, Anthony Pagniez (PhAN, INRA, Nantes, France) for protein content measurement in milk and Guillaume Poupeau as well as Isabelle Jicquel (PhAN, INRA, Nantes, France) for animal care.

Financial support

A. Martin Agnoux was the recipient of a doctoral fellowship from PONAN (Pôle Nantais Alimentation et Nutrition).

Conflict of interest

The authors have nothing to declare.

Authorship

A.M.A. and M.C.A-G. wrote the first draft of the manuscript. A.M.A., P.P., J.P.A. and M.C.A-G. contributed to formulate the research questions, designed the study and edited the manuscript. A.M.A. provided the original artwork. A.M.A. contributed to the animal care. A.M.A. and M.C.A-G. are the guarantors of this work and, as such, have full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- 1 Waterland RA & Garza C (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* **69**, 179-197.
- 2 WHO (2012) *International Travel and Health 2012: Situation as on 1 January 2012*: Geneva: World Health Organization
- 3 Kramer MS, Guo T, Platt RW *et al* (2003) Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. *Am J Clin Nutr* **78**, 291-295.
- 4 Hamosh M (2001) Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin N Am* **48**, 69-86.
- 5 Savino F & Liguori SA (2008) Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clin Nutr* **27**, 42-47.
- 6 Foltz M, Meynen EE, Bianco V *et al* (2007) Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J Nutr* **137**, 953-958.
- 7 Hanson L & Winberg J (1972) Breast milk and defence against infection in the newborn. *Archiv Dis Childhood* **47**, 845-848.
- 8 Nagasawa T, Kiyosawa I & Kuwahara K (1972) Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J Dairy Sci* **55**, 1651-1659.
- 9 Lönnerdal B, Forsum E, Gebre-Medhin M *et al* (1976) Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. II. Lactose, nitrogen, and protein contents. *Am J Clin Nutr* **29**, 1134-1141.
- 10 Duijts L, Ramadhani MK & Moll HtA (2009) Breastfeeding protects against infectious diseases during infancy in industrialized countries. A systematic review. *Matern Child Nutr* **5**, 199-210.
- 11 Owen CG, Martin RM, Whincup PH *et al* (2005) Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics* **115**, 1367-1377.
- 12 Ozanne SE & Constancia M (2007) Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**, 539-546.
- 13 Butte NF (2009) Impact of infant feeding practices on childhood obesity. *J Nutr* **139**, 412S-416S.
- 14 Adair LS (2009) Methods appropriate for studying the relationship of breast-feeding to obesity. *J Nutr* **139**, 408S-411S.
- 15 Baird J, Fisher D, Lucas P *et al* (2005) Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ* **331**, 929-935.
- 16 Barker DJ, Osmond C, Forsén TJ *et al* (2005) Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *New Engl J Med* **353**, 1802-1809.
- 17 Ong K (2006) Size at birth, postnatal growth and risk of obesity. *Horm Res* **65**, 65-69.
- 18 Koletzko B, Beyer J, Brands B *et al* (2013) Early influences of nutrition on postnatal growth. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*.
- 19 Beare JL (1961) The influence of dietary fat on the fatty acid composition of liver, carcass, and milk of rats. *Can J Biochem Physiol* **39**, 1855-1863.
- 20 Grigor MR, Allan J, Carne A *et al* (1986) Milk composition of rats feeding restricted litters. *Biochem J* **233**, 917.
- 21 Del Prado M, Delgado G & Villalpando S (1997) Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr* **127**, 458-462.

- 22 Rolls B, Gurr M, Van Duijvenvoorde P *et al* (1986) Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. *Physiol Behav* **38**, 185-190.
- 23 Martin Agnoux A, Alexandre-Gouabau M-C, Dréan G *et al* (2013) Relative contribution of fetal and postnatal nutritional periods on feeding regulation in adult rats. *Acta Physiol (in the press)*.
- 24 Coupe B, Dutriez-Casteloot I, Breton C *et al* (2009) Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol* **21**, 40-48.
- 25 Ferchaud-Roucher V, Desnots E, Naël C *et al* (2013) Use of UPLC-ESI-MS/MS to quantitate free amino acid concentrations in micro-samples of mammalian milk *SpringerPlus*, (just accepted).
- 26 Bligh E & Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- 27 Morrison WR & Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* **5**, 600-608.
- 28 Alexandre-Gouabau MC, Courant F, Le Gall G *et al* (2011) Offspring metabolomic response to maternal protein restriction in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR). *J Proteome Res* **10**, 3292-3302.
- 29 Courant F, Pinel G, Bichon E *et al* (2009) Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst* **134**, 1637-1646.
- 30 Courant F, Royer AL, Chéreau S *et al* (2012) Implementation of a semi-automated strategy for the annotation of metabolomic fingerprints generated by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry from biological samples. *Analyst* **137**, 4958-4967.
- 31 Trygg J, Holmes E & Lundstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* **6**, 469-479.
- 32 Cloarec O, Dumas ME, Trygg J *et al* (2005) Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in ¹H NMR spectroscopic metabonomic studies. *Anal Chem* **77**, 517-526.
- 33 Kullgren A, Samuelsson LM, Larsson DJ *et al* (2010) A metabolomics approach to elucidate effects of food deprivation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol-Reg I* **299**, R1440-R1448.
- 34 Salehi A, Gunnerud U, Muhammed SJ *et al* (2012) The insulinogenic effect of whey protein is partially mediated by a direct effect of amino acids and GIP on beta-cells. *Nutr Metab (Lond)* **9**, 48.
- 35 Adeghate E, Ponery AS & Sheen R (2001) Streptozotocin-induced diabetes mellitus is associated with increased pancreatic tissue levels of noradrenaline and adrenaline in the rat. *Pancreas* **22**, 311-316.
- 36 Lucas A, Fewtrell M & Cole T (1999) Fetal origins of adult diseases, the hypothesis revisited. *BMJ: British Medical Journal* **319**, 245.
- 37 Plagemann A (2008) A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation. *J Matern-Fetal Neol M* **21**, 143-148.
- 38 Grigor MR, Allan JE, Carrington JM *et al* (1987) Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats. *J Nutr* **117**, 1247-1258.
- 39 Sturman JA, Devine E, Resnick O *et al* (1986) Maternal protein malnutrition in the rat: effect on protein and two enzymes in the milk. *Nutr Res* **6**, 437-442.

- 40 Pine AP, Jessop NS & Oldham JD (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. *Br J Nutr* **71**, 13-27.
- 41 Haug A, Hostmark AT & Harstad OM (2007) Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health Dis* **6**, 1-16.
- 42 Bautista CJ, Boeck L, Larrea F *et al* (2008) Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res* **63**, 358-363.
- 43 Moretto VLB, Gonçalves TSS, Kawashita NH *et al* (2011) Low-protein diet during lactation and maternal metabolism in rats. *ISRN Obstet Gynecol* **2011**, 1-7.
- 44 Grimble R (1981) The effect of dietary protein concentration and quality on the hormonal status, protein metabolism and milk protein concentrations of rats. *Ann Nutr Metab* **25**, 221-227.
- 45 Crnic L.S. CHP (1978) Models of infantile malnutrition in rats: effects on milk. *J Nutr* **108**, 1755-1760.
- 46 Hilakivi-Clarke L & de Assis S (2006) Fetal origins of breast cancer. *Trends Endocrin Met* **17**, 340-348.
- 47 Friggens N (1990) The effects of feed composition and level on lactational performance in rats and dairy cows: a basic approach to feed description. PhD Thesis, University of Edinburgh.
- 48 Vernon RG (2005) Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res* **72**, 460-469.
- 49 Rudolph MC, McManaman JL, Phang T *et al* (2007) Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiol Genomics* **28**, 323-336.
- 50 Bautista CJ, Rodriguez-Gonzalez GL, Torres N *et al* (2013) Protein Restriction in the Rat Negatively Impacts Long-chain Polyunsaturated Fatty Acid Composition and Mammary Gland Development at the End of Gestation. *ARCMED* 1830 proof-2013.08.002.
- 51 Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett* **117**, K93-K105.
- 52 Whitehead R (1979) Nutrition and lactation. *Postgrad Med J* **55**, 303-310.
- 53 Coward W (1984) Measuring milk intake in breast-fed babies. *J Pediatr Gastr Nutr* **3**, 275-279.
- 54 Rasmussen KM KC (2004) Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics* **113**, e465-471.
- 55 Schanler GC (1987) Plasma amino acid differences in very low birth weight infants fed either human milk or whey-dominant cow milk formula. *Pediatr Res*, **21**, 301.
- 56 Wu G (2010) Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **1**, 31-37.
- 57 Cherif H, Reusens B, Ahn M *et al* (1998) Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. *J Endocrinol* **159**, 341-348.
- 58 Östman EM, Elmstahl HGL & Björck IM (2001) Inconsistency between glycemic and insulinemic responses to regular and fermented milk products. *Am J Clin Nutr* **74**, 96-100.
- 59 Rees WD, Has S, Buchan V *et al* (1999) The effects of maternal protein restriction on the growth of the rat fetus and its amino acid supply. *British J Nutr* **81**, 243-250.
- 60 Pamblanco M, Portoles M, Paredes C *et al* (1989) Free amino acids in preterm and term milk from mothers delivering appropriate-or small-for-gestational-age infants. *The Am J Clin Nutr* **50**, 778-781.
- 61 Carver JD & Allan Walker W (1995) The role of nucleotides in human nutrition. *J Nutr Biochem* **6**, 58-72.
- 62 Warman NL & Rasmussen KM (1983) Effects of malnutrition during the reproductive cycle on nutritional status and lactational performance of rat dams. *Nutr Res* **3**, 527-545.

- 63 Grigor MR, Carrington JM, Arthur PG *et al* (1989) Lack of correlation between milk glucose concentrations and rates of milk production in the rat. *J Dairy Res* **56**, 37-43.
- 64 Lever M & Slow S (2010) The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem* **43**, 732-744.
- 65 Tsopmo A, Diehl-Jones BW, Aluko RE *et al* (2009) Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties. *Pediatr Res* **66**, 614-618.
- 66 Bartsch H, Nair J & Owen RW (2002) Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem* **383**, 915-921.
- 67 Bartsch H & Nair J (2004) Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* **28**, 385-391.
- 68 Cicero AF, Nascetti S, Lopez-Sabater MC *et al* (2008) Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study. *J Am Coll Nutr* **27**, 314-320.
- 69 Buczynski MW, Dumlao DS & Dennis EA (2009) Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res* **50**, 1015-1038.
- 70 Nettleton JA & Katz R (2005) n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *J Am Diet Assoc* **105**, 428-440.
- 71 Kalupahana NS, Claycombe KJ & Moustaid-Moussa N (2011) (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv Nutr* **2**, 304-316.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Macronutrient	Control (20 % protein)	Low protein (8 % protein)
<u>Protein</u>		
Casein	220	90
<u>Carbohydrate</u>		
Cornstarch	80	80
Maltodextrin 10	552	682
Sucrose		
<u>Fat</u>		
Vegetable oil	43	43
Milk fat		
Cellulose	50	50
Vitamin Mix	10	10
Mineral Mix	47	48
Energy density (kcal/g)	3.7	3.7
<u>% macronutrient kcal/g</u>		
Protein	20	8.0
Carbohydrate	63	76
Fat	4.3	4.3
<u>Total Amino acids (g/kg)</u>		
Lysine	13.7	5.6
Methionine	7.3	3.0
Cystine	0.6	0.2
Threonine	7.8	3.2
Tryptophane	2.6	1.0
Isoleucine	11.1	4.5
Arginine	6.7	2.8
Phenylalanine	8.0	3.3
Histidine	5.1	2.1
Leucine	20.9	8.6
Tyrosine	10.4	4.2
Valine	12.9	5.3
Alanine	4.4	1.8
Aspartic acid	10.2	4.2
Glutamic acid	38.6	15.8
Glycine	5.6	2.3
Proline	17.7	7.2
Serine	6.2	2.5

Diet suppliers: Control and low protein diets, A3.0B Diets (Woerden, the Netherlands); standard chow, SAFE, Augy, France.

Table S2. Effect of perinatal protein restriction on metabolome in dams milk at 1, 8, 14 and 18 days of lactation.

days of lactation	D1		D8		D14		D18	
metabolites	R vs C ratio	R vs C p-value	R vs C ratio	R vs C p-value	R vs C ratio	R vs C p-value	R vs C ratio	R vs C p-value
Carnitine ^{a, b}	1.62	0.063	2.18	0.1320	1.73	0.2036	2.12	0.0018
Hexanoylcarnitine ^{a, b}	1.63	0.036	1.49	0.1206	1.37	0.1287	1.44	0.2237
Nicotinamide ^{a, b}	1.70	0.0524	1.04	0.8182	1.38	0.0236	0.46	0.0822
Betaine ^{a, b}	1.18	0.2799	1.41	0.1320	2.06	P<0.0001	1.83	P<0.0001

Results are expressed as ratio of abundance in R milk/abundance in C milk. Differences between metabolites abundances in milk R *versus* milk C were tested by Man-Whitney. *, **, *** C vs R, p<0.5 or p<0.01 or p<0.001 respectively.

^a Discriminant metabolites were putatively annotated (i.e. without chemical reference standards, based upon physicochemical properties and/or spectral similarity with public/commercial spectral libraries such as METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>) or HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)) and ^b definitively annotated with our home data base (i.e. based upon characteristic physicochemical properties of a chemical reference standards) (Courant *et al.*, 2012).

Perspectives

Les résultats et éléments de discussion présentés dans cette section feront l'objet d'un quatrième article encore en cours de rédaction au moment de produire ce mémoire de thèse.

Les variations observées au cours de notre troisième étude s'agissant de la composition du lait selon le régime maternel pourraient s'avérer déterminantes dans la programmation du métabolisme de la descendance. Dans l'optique d'identifier les adaptations métaboliques précoces de la descendance qui pourraient dépendre des constituants du lait et ainsi être impliquées dans la programmation périnatale du métabolisme de la descendance, nous avons étudié la trajectoire métabolique postnatale de la descendance selon que le développement *in utero* ait été altéré ou non.

Pour répondre à cet objectif, nous avons de nouveau appliqué une approche métabolomique semi-quantitative, au niveau plasmatique et à différents temps de cinétique allant de la naissance au sevrage (données acquises mais encore en cours d'analyse). Nous avons combiné ces mesures intégratives à une analyse plus ciblée et quantitative du métabolisme énergétique à 16 jours d'allaitement – période clef dans le développement métabolique – par la détermination des concentrations plasmatiques en substrats énergétiques (glucose, corps cétoniques, AGNE) et par l'analyse des produits du catabolisme lipidique et protéique en évaluant les profils en acylcarnitines au niveau systémique des rats mâles de chaque groupe.

Les résultats issus de ce quatrième volet de notre travail de thèse laissent entrevoir un grand nombre de variations dans le métabolisme des rats au fur et à mesure de l'avancement de la lactation, notamment au vu de l'empreinte métabolomique générée chez les rats mâles âgés de 16 jours. L'analyse par approche PLS (partial least square) appliquée aux blocs de variables générées par l'analyse métabolomique permet de classer les rats selon deux composantes principales, à savoir la trajectoire de croissance prénatale (composante 3 de la figure 1) et le type de lait reçu (composante 2 de la figure 1). Ce phénotypage sérique par approche métabolomique a permis d'identifier un ensemble de métabolites (annexe 1) qui pourraient permettre de mieux appréhender les altérations observées à l'âge adulte chez nos rats nés avec un retard de croissance intra-utérin, ayant fait ou non l'expérience d'une croissance postnatale accélérée ou encore ayant simplement eu une croissance néonatale lente. L'analyse de ces données est toujours en cours au moment de

l'écriture de ce manuscrit. Au regard du tableau présenté en annexe 1, il est toutefois possible d'extraire dès à présent plusieurs informations. Les métabolites impliqués dans le métabolisme des acides nucléiques (purines et pyrimidine – cytidine, cytosine), ainsi que la plupart des acides aminés identifiés, présentent des abondances moindres chez les ratons allaités par les rates restreintes en protéines, indépendamment de la croissance *in utero*, par rapport à ceux allaités par les rates nourries d'un régime contrôle.

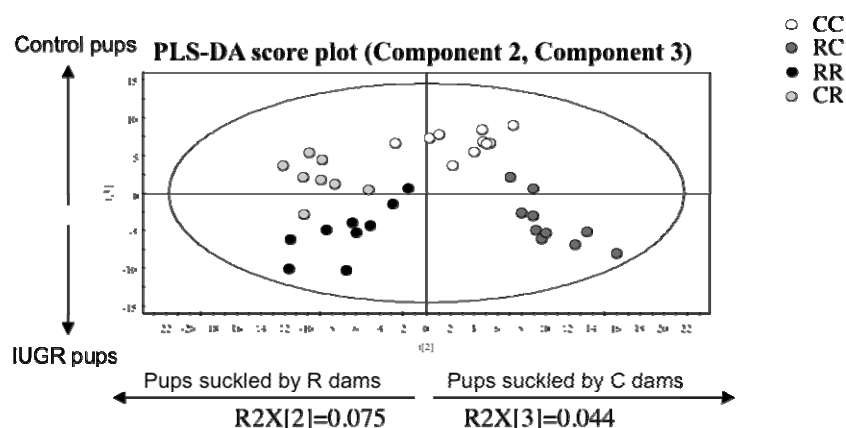


Figure 1. PLS-DA analysis of 16-day-old male CC, RC, RR and CR offspring using three latent factors from metabolomics profiles ($p\text{-value}=5,84e^{-006}$). Each LC-HRMS profile was constituted by 1874 MS signals after positive electrospray ionisation.

Un nombre relativement important de métabolites rattachés au métabolisme lipidique et à l'oxydation des acides gras ont également pu être annotés à partir de ces empreintes métabolomiques, suggérant de nombreuses différences dépendantes de la nature du lait reçu par les ratons (annexe 1). D'autre part, nous avons pu voir dans la première étude que la trajectoire de croissance postnatale des ratons, en termes de gain pondéral et de masse adipeuse, dépendait du lait reçu par ces derniers, indépendamment de leur poids de naissance. En effet, les ratons allaités par des rates R (RR et CR) (lait plus riche en lipides) présentent un poids et une masse adipeuse moindre que les ratons allaités par les rates C (CC et RC) et ce, tout au long de la période d'allaitement. Ces différences marquées dans le métabolisme lipidique sont associées à des concentrations en substrats lipidiques et à des profils en acylcarnitines des ratons de 16 jours également dépendantes du lait reçu par les petits. Les concentrations circulantes en AGNE, plus faibles chez les ratons allaités par les rates R, sont associées à des teneurs circulantes plus importantes en carnitine ainsi qu'en acycarnitines (Table 1). Ceci pourrait être le reflet d'une β -oxydation plus importante chez ces ratons. Au

contraire, les rats nés par les rates C mais nés avec un RCIU présentent des concentrations plus faibles en corps cétoniques ainsi qu'en acylcarnitines malgré des teneurs plus importantes en AGNE, ce qui pourrait être le reflet d'une moindre β -oxydation. De façon intéressante, les profils décrits sur le métabolisme lipidique et l'oxydation des acides gras à 16 jours de vie chez ces rats sont en adéquation avec les variations décrites dans ces mêmes groupes de rats à l'âge adulte (cf article 2).

Table 1. Concentration levels ($\mu\text{mol/L}$) of NEFA, ketone body and carnitine ester measured in plasma of suckling CC, RC, RR and CR 16-day-old male rat offspring

Analyte ($\mu\text{mol/L}$) n=5-10	CC	RC	RR	CR
	Born control & suckled by C dams	Born IUGR & suckled by C dams	Born IUGR & suckled by R dams	Born control & suckled by R dams
NEFA (mmol/L)	1.45 $\pm$ 0.18	1.43 $\pm$ 0.16	0.82 $\pm$ 0.06***\$	0.89 $\pm$ 0.07***\$
Ketone body	1378 $\pm$ 51	891 $\pm$ 79***	1391 $\pm$ 62\$\$\$	1291 $\pm$ 40\$\$\$
Total carnitine	71.4 $\pm$ 3.83	71.0 $\pm$ 4.65	113.0 $\pm$ 3.12***\$	116.0 $\pm$ 18.3***\$
Free carnitine	43.4 $\pm$ 3.11	47.3 $\pm$ 3.76	81.3 $\pm$ 3.93***\$	77.3 $\pm$ 13.5*\$
Total acyl-carnitine	28.0 $\pm$ 1.34	23.7 $\pm$ 1.26	31.8 $\pm$ 1.51\$\$	38.6 $\pm$ 5.2*\$
Acetyl-CN (C2)	23.1 $\pm$ 1.27	19.3 $\pm$ 1.13	26.4 $\pm$ 1.71\$	32.6 $\pm$ 4.76*\$
Propionyl-CN (C3)	0.459 $\pm$ 0.032	0.444 $\pm$ 0.060	0.456 $\pm$ 0.065	0.575 $\pm$ 0.131
Butyryl-CN (C4)	0.679 $\pm$ 0.039	0.464 $\pm$ 0.052**	0.500 $\pm$ 0.058**	0.623 $\pm$ 0.078
Tiglyl-CN (C5:1)	0.026 $\pm$ 0.009	0.037 $\pm$ 0.010	0.045 $\pm$ 0.018	0.033 $\pm$ 0.012
Isovaleryl-CN (C5)	0.611 $\pm$ 0.059	0.417 $\pm$ 0.036*	1.014 $\pm$ 0.158*\$	0.752 $\pm$ 0.083\$
3-OH-Isovaleryl-CN (C5OH)	0.290 $\pm$ 0.021	0.187 $\pm$ 0.038*	0.258 $\pm$ 0.033	0.215 $\pm$ 0.039
Malonyl-CN (C3DC)	0.194 $\pm$ 0.032	0.264 $\pm$ 0.057	0.137 $\pm$ 0.026	0.282 $\pm$ 0.072
Methylmalonyl-CN (C4DC)	0.205 $\pm$ 0.033	0.152 $\pm$ 0.022	0.149 $\pm$ 0.018	0.204 $\pm$ 0.036
Glutaryl-CN (C5DC)	0.077 $\pm$ 0.009	0.051 $\pm$ 0.006*	0.057 $\pm$ 0.013	0.073 $\pm$ 0.003\$
Hexanoyl-CN (C6)	0.183 $\pm$ 0.031	0.155 $\pm$ 0.036	0.212 $\pm$ 0.032	0.293 $\pm$ 0.068
Octanoyl-CN (C8)	0.122 $\pm$ 0.014	0.106 $\pm$ 0.005	0.083 $\pm$ 0.026	0.134 $\pm$ 0.023
Decenoyl-CN (C10:1)	0.059 $\pm$ 0.008	0.069 $\pm$ 0.009	0.067 $\pm$ 0.019	0.046 $\pm$ 0.011
Cecanoyl-CN (C10)	0.105 $\pm$ 0.023	0.092 $\pm$ 0.007	0.094 $\pm$ 0.019	0.106 $\pm$ 0.021
Dodecanoyl-CN (C12)	0.490 $\pm$ 0.056	0.555 $\pm$ 0.031	0.437 $\pm$ 0.065	0.635 $\pm$ 0.080
Adipyl-CN (C6DC)	0.238 $\pm$ 0.067	0.254 $\pm$ 0.111	0.186 $\pm$ 0.026	0.146 $\pm$ 0.026
Tetradecenoyl-CN (C14:1)	0.078 $\pm$ 0.013	0.066 $\pm$ 0.021	0.180 $\pm$ 0.037*\$	0.198 $\pm$ 0.065
Tetradecanoyl-CN (C14)	0.380 $\pm$ 0.020	0.456 $\pm$ 0.039	0.394 $\pm$ 0.019##	0.602 $\pm$ 0.050**
3-OH-tetradecanoyl-CN (C14OH)	0.013 $\pm$ 0.007	0.052 $\pm$ 0.023	0.059 $\pm$ 0.020	0.047 $\pm$ 0.007*
Palmitoyl-CN (C16)	0.329 $\pm$ 0.044	0.276 $\pm$ 0.049	0.416 $\pm$ 0.072	0.497 $\pm$ 0.061\$
3-OH-Hexadecenoyl-CN (C16:1OH)	0.049 $\pm$ 0.011	0.029 $\pm$ 0.005	0.050 $\pm$ 0.009	0.083 $\pm$ 0.030
3-OH-Hexadecanoyl-CN (C16OH)	0.040 $\pm$ 0.010	0.014 $\pm$ 0.004*	0.039 $\pm$ 0.008\$	0.018 $\pm$ 0.005
Oleyl-CN (C18:1)	0.114 $\pm$ 0.023	0.099 $\pm$ 0.021	0.171 $\pm$ 0.021*\$	0.231 $\pm$ 0.048\$
Stearoyl-CN (C18)	0.151 $\pm$ 0.019	0.119 $\pm$ 0.012	0.166 $\pm$ 0.016\$	0.120 $\pm$ 0.030
3-OH-Oleyl-CN (C18:1OH)	0.025 $\pm$ 0.006	0.026 $\pm$ 0.006	0.028 $\pm$ 0.006	0.026 $\pm$ 0.004
3-OH-Stearoyl-CN (C18OH)	0.022 $\pm$ 0.011	0.016 $\pm$ 0.006	0.022 $\pm$ 0.007	0.018 $\pm$ 0.009

Total carnitine= total acylcarnitine + free carnitine; Total acylcarnitine= $\sum$ acylcarnitines; CN: Carnitine; NEFA: non esterified fatty acid

Values are means $\pm$ SEM

*, ** vs CC, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ respectively; \$, \$\$, \$\$\$ vs RC, $p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$ respectively; #, ## vs CR, $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

Means labelled with a "b" are significantly different at 5% for one group of rats between chow and western diets.

Ainsi, comme nous l'avons souligné dans la discussion du chapitre 2, des altérations du métabolisme lipidique pourraient être à l'origine des différences observées sur le métabolisme général de la descendance, et notamment dans la prédisposition à perdre la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline chez les individus nés avec un RCIU. Les résultats préliminaires présentés ci-dessus laissent ainsi présager que ces altérations du métabolisme lipidique observées à l'âge adulte se mettraient en place pendant les périodes fœtale et postnatale, et que la composition du lait pourrait jouer un rôle déterminant dans ces processus adaptatifs.

Le RCIU et sa prise en charge clinique, quelles perspectives ?

La prise en charge des nourrissons nés avec un RCIU reste encore un sujet critique. Les connaissances relatives aux besoins spécifiques de ces nourrissons restent encore éparpillées et sujet à débat, notamment du fait des taux élevés de morbidité et de mortalité de ces nouveau-nés (Moco et al, 2013). Les études métabolomiques réalisées sur de faibles quantités de fluides biologiques (urine, plasma) ont apporté de nouvelles indications sur les altérations métaboliques consécutives au RCIU et pourraient laisser entrevoir d'éventuels ajustements nutritionnels précoces (Desai et al, 2011; Conde-Agudelo et al, 2013). Toutefois, à ce jour il n'existe aucune étude qui ait permis de mettre en avant des biomarqueurs suffisamment prédictifs d'un RCIU pour être utilisés dans un contexte de pratique clinique.

Dans notre quatrième étude, et parmi les métabolites identifiés à ce jour au sein des empreintes métabolomiques réalisées à la naissance au niveau plasmatique, nos résultats montrent des variations dans les teneurs de métabolites impliqués dans les défenses antioxydantes (glycine, carnosine, trigonelline), le métabolisme des acides biliaires (acide cholique, acide taurochlorique, taurine) ou encore dans le métabolisme de la lysine et de l'urée (homoarginine, ornithine). Dans une étude réalisée sur des échantillons d'urine de nourrissons nés avec un RCIU, une plus grande excrétion de myo-inositol, sarcosine, créatine et créatinine ont été rapportées (Desai et al, 2011). Ces variations pourraient potentiellement être le reflet d'altérations dans des fonctions de signalisations, du métabolisme bêtaïne/homocystéine et de la masse maigre (muscle), respectivement.

Les résultats issus des analyses de type « omique » restent cependant avant tout descriptifs, et ne permettent pas de définir avec précision les niveaux d'altérations touchant les voies métaboliques concernées. Toutefois, le champ d'exploration du métabolome

progresses à grand pas, et permet aujourd'hui l'identification d'une quantité importante de ses composants. La mise en relation des jeux de données générés par ces différentes approches par l'utilisation d'outils bioinformatiques et la modélisation des réseaux métaboliques représente un enjeu déterminant pour les années à venir et la compréhension du système étudié d'un point de vue intégratif. De plus, le volume des échantillons nécessaires à ce type d'approche étant très faible, celles-ci sont compatibles avec une application dans le domaine de la recherche pédiatrique où l'accès aux échantillons est réduit, tant en volume qu'en type d'échantillon (sang, urine etc.).

Conclusion générale

La programmation du métabolisme induite par l'exposition du fœtus ou du nouveau né à un environnement délétère (nutritionnel, hormonal, chimique etc.) est aujourd'hui un phénomène scientifique reconnu. L'identification des voies métaboliques impliquées dans l'altération du comportement alimentaire ou du métabolisme énergétique, qui pourraient prédisposer ou non certains individus à devenir obèse ou à développer un DT2M, s'étaye au fil des études récentes conduites sur ce sujet. Leurs connectivités complexes restent cependant un obstacle dans la compréhension de la séquence physiopathologique de ces maladies.

Dans la première partie de notre étude (cf. article 1), nous nous sommes intéressés aux modifications du comportement alimentaire à long terme dans le cadre d'une programmation périnatale induite par restriction protéique maternelle, où nous avons observé des changements propres aux trajectoires de croissance pré- et postnatale. D'une part nous avons montré que l'induction d'un retard de croissance intra-utérin, indépendamment de la vitesse de croissance postnatale, n'affectait pas les préférences alimentaires mais était à l'origine d'une modification des rythmes de la prise alimentaire sur une période de 24h, dès lors que la descendance était exposée à un régime hypercalorique. Ceci était associé à une accréation significative de la masse adipeuse totale. Dans le cas où uniquement la croissance postnatale est ralentie, une préférence pour les aliments gras a été observée ainsi qu'une hyperphagie plus importante en l'absence d'accréation adipeuse en conditions nutritionnelles pléthoriques.

Dans la seconde partie de notre étude consacrée à la pérennité de l'empreinte périnatale (article 2), nous avons plus particulièrement étudié le métabolisme énergétique de la descendance associée à l'insulino-sensibilité des tissus périphériques, et nous avons mis en évidence, par l'utilisation combinée d'approches intégratives et ciblées, des perturbations du métabolisme énergétique qui s'avèrent être subtiles chez le rat adulte, et ce, quelle que soit la fenêtre de temps précoce considérée. Un RCIU aurait ainsi des conséquences plus néfastes sur le métabolisme énergétique et la perte (de façon âge-dépendant) de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline lorsque la croissance postnatale est rapide plutôt que ralentie. Le ralentissement de la croissance postnatale des sujets nés avec un RCIU permet d'atténuer certaines altérations liées au métabolisme énergétique et à l'insulino-résistance. Il n'en reste pas moins que la réponse adaptative physiologique et comportementale (cf article 1) à un environnement alimentaire hypercalorique est semblable chez ces individus adultes, et en

faveur d'une prédisposition à l'installation de maladies chroniques,. D'autre part, une croissance postnatale faible en l'absence de RCIU semble, au contraire, avoir un effet protecteur contre l'accrétion adipeuse ainsi que face au développement d'une insulino-résistance en situation obésogène.

Réunis ensemble, ces résultats indiquent au final que les effets à long terme sur le métabolisme et le comportement alimentaire, provoqués par un régime maternel hypoprotidique, varient selon la fenêtre précoce de programmation périnatale. Ces modifications pourraient contribuer aux spécificités phénotypiques observées entre les différents groupes d'animaux étudiés dont les modifications précoces du métabolisme pourraient contribuer à ces adaptations délétères ou non.

En effet, dans la troisième partie de nos travaux, nous avons montré qu'une restriction protéique maternelle induisait des modifications de la composition du lait, elles mêmes associées à des modifications dans la trajectoire métabolique postnatale. Ces modifications semblent déterminantes dans la mise en place des altérations métaboliques observées à l'âge adulte. Les différences transitoires ainsi que pérennes observées sur le métabolisme énergétique, pendant des fenêtres de temps clefs du développement postnatal, représentent des axes de recherche décisifs pour la compréhension de la programmation du métabolisme énergétique. Au regard des résultats présentés sur le métabolisme énergétique et la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline chez les individus adultes ayant eu une croissance néonatale faible, il serait intéressant, en terme d'étude de mécanismes de protection, d'étudier les effets métaboliques à long terme associés à une dose nutritionnelle postnatale de composés identifiés par l'étude très étendue de la composition du lait et propres à la descendance protégée des dysfonctionnements systémiques associés au RCIU.

Enfin, ces résultats préliminaires quant aux effets de la variation qualitative du lait suite à la modulation du régime maternel et leur répercussion sur le métabolisme énergétique de la descendance pourraient ouvrir de nouvelles perspectives en termes d'évaluation des besoins nutritionnels du nouveau-né. À ce jour, il n'existe en effet aucun consensus sur ce sujet auprès des néonatalogistes, et la prise en charge nutritionnelle des nouveaux-nés ayant eu une croissance fœtale à risque peu varier d'un centre hospitalier à un autre.

Références bibliographiques

-A-

- Adams, S. H., Hoppel, C. L., Lok, K. H., Zhao, L., Wong, S. W., Minkler, P. E., Hwang, D. H., Newman, J. W. and Garvey, W. T. (2009). Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *J Nutr.* 139, (6). 1073-81.
- Adeghate, E., Ponery, A. S., El-Sharkawy, T. and Parvez, H. (2001). L-arginine stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *Amino Acids.* 21, (2). 205-9.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D. and Flier, J. S. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest.* 101, (5). 1020-7.
- Al-Almaie, S. M. (2005). Prevalence of obesity and overweight among Saudi adolescents in Eastern Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 26, (4). 607-11.
- Alexandre-Gouabau MC, Courant F, Le Gall G, Moyon T, Darmaun D, Parnet P, Coupe B, Antignac JP: Offspring metabolomic response to maternal protein restriction in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR). *J Proteome Res* 2011;10:3292-3302.
- Allen, Y. S., Adrian, T. E., Allen, J. M., Tatamoto, K., Crow, T. J., Bloom, S. R. and Polak, J. M. (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science.* 221, (4613). 877-9.
- Amarger, V. and Parnet, P. (2013). Early-Life Nutrition and Long-Term Appetite Regulation. In: *Early Life Nutrition, Adult Health and Development. Lessons from Changing Dietary Patterns, Famines and Experimental Studies.* L. H. Lumey and A. Vaiserman (Ed), (Eds), Nova Science Publisher, Inc., New York (USA). Chapter XIII. 281-303.
- Anand, B. K. and Brobeck, J. R. (1951). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 77, (2). 323-4.
- Ando, H., Yanagihara, H., Hayashi, Y., Obi, Y., Tsuruoka, S., Takamura, T., Kaneko, S. and Fujimura, A. (2005). Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology.* 146, (12). 5631-6.
- Araki, E., Lipes, M. A., Patti, M. E., Bruning, J. C., Haag, B., 3rd, Johnson, R. S. and Kahn, C. R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature.* 372, (6502). 186-90.

- Arenz, S., Ruckerl, R., Koletzko, B. and Von Kries, R. (2004). Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28, (10). 1247-56.
- Armstrong, J. and Reilly, J. J. (2002). Breastfeeding and lowering the risk of childhood obesity. *Lancet.* 359, (9322). 2003-4.
- Attig, L., Gabory, A. and Junien, C. (2010). Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 13, (3). 284-93.
- Attig, L., Solomon, G., Ferezou, J., Abdennebi-Najar, L., Taouis, M., Gertler, A. and Djiane, J. (2008). Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond).* 32, (7). 1153-60.
- Auestad, N., Korsak, R. A., Morrow, J. W. and Edmond, J. (1991). Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem.* 56, (4). 1376-86.

-B-

- Bain, J. R., Stevens, R. D., Wenner, B. R., Ilkayeva, O., Muoio, D. M. and Newgard, C. B. (2009). Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge. *Diabetes.* 58, (11). 2429-43.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Huang, W., Jaspan, J. B. and Maness, L. M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides.* 17, (2). 305-11.
- Barker, D. J. (2004). The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl.* 93, (446). 26-33.
- Barnes, S. K. and Ozanne, S. E. (2011). Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Prog Biophys Mol Biol.* 106, (1). 323-36.
- Bartlett, K. and Eaton, S. (2004). Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem.* 271, (3). 462-9.
- Baskin, D. G., Seeley, R. J., Kuijper, J. L., Lok, S., Weigle, D. S., Erickson, J. C., Palmiter, R. D. and Schwartz, M. W. (1998). Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes.* 47, (4). 538-43.
- Beare, J. L. (1961). The influence of dietary fat on the fatty acid composition of liver, carcass, and milk of rats. *Can J Biochem Physiol.* 39, 1855-63.

- 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.
- Benani, A., Hryhorczuk, C., Gouaze, A., Fioramonti, X., Brenachot, X., Guissard, C., Krezymon, A., Duparc, T., Colom, A., Nedelec, E., Rigault, C., Lemoine, A., Gascuel, J., Gerardy-Schahn, R., Valet, P., Knauf, C., Lorsignol, A. and Penicaud, L. (2012). Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J Neurosci.* 32, (35). 11970-9.
- Berends, L. M., Fernandez-Twinn, D. S., Martin-Gronert, M. S., Cripps, R. L. and Ozanne, S. E. (2013). Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *Int J Obes (Lond).* 37, (8). 1051-7.
- Berger, K., Winzell, M. S., Mei, J. and Erlanson-Albertsson, C. (2004). Enterostatin and its target mechanisms during regulation of fat intake. *Physiol Behav.* 83, (4). 623-30.
- Berry, M. N., Phillips, J. W., Henly, D. C. and Clark, D. G. (1993). Effects of fatty acid oxidation on glucose utilization by isolated hepatocytes. *FEBS Lett.* 319, (1-2). 26-30.
- Berthoud, H. R. (2006). Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring).* 14 Suppl 5, 197S-200S.
- Berthoud, H. R. and Morrison, C. (2008). The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol.* 59, 55-92.
- Bertile, F., Oudart, H., Criscuolo, F., Maho, Y. L. and Raclot, T. (2003). Hypothalamic gene expression in long-term fasted rats: relationship with body fat. *Biochem Biophys Res Commun.* 303, (4). 1106-13.
- 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.
- Bieswal, F., Hay, S. M., Mckinnon, C., Reusens, B., Cuignet, M., Rees, W. D. and Remacle, C. (2004). Prenatal protein restriction does not affect the proliferation and differentiation of rat preadipocytes. *J Nutr.* 134, (6). 1493-9.
- Bixel, M. G. and Hamprecht, B. (1995). Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J Neurochem.* 65, (6). 2450-61.
- Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E. and Flier, J. S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell.* 1, (4). 619-25.

- Bol, V. V., Delattre, A. I., Reusens, B., Raes, M. and Remacle, C. (2009). Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297, (2). R291-9.
- Bol, V. V., Reusens, B. M. and Remacle, C. A. (2008). Postnatal catch-up growth after fetal protein restriction programs proliferation of rat preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)*. 16, (12). 2760-3.
- Bolinder, J., Kager, L., Ostman, J. and Arner, P. (1983). Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes*. 32, (2). 117-23.
- Boujendar, S., Reusens, B., Merezak, S., Ahn, M. T., Arany, E., Hill, D. and Remacle, C. (2002). Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 45, (6). 856-66.
- 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.
- Bouret, S. G. and Simerly, R. B. (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet*. 70, (4). 295-301.
- Bray, M. S. and Young, M. E. (2007). Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev*. 8, (2). 169-81.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 89, (3). 331-40.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*. 7, (2). 95-6.
- Bryant, N. J., Govers, R. and James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3, (4). 267-77.
- Buhl, E. S., Neschen, S., Yonemitsu, S., Rossbacher, J., Zhang, D., Morino, K., Flyvbjerg, A., Perret, P., Samuel, V., Kim, J., Cline, G. W. and Petersen, K. F. (2007). Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and hepatic insulin resistance in low-birth-weight rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293, (5). E1451-8.
- 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.

-C-

- Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 29, (1). 18-24.
- Caro, J. F., Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Opentanova, I., Goldman, W. H., Lynn, R. B., Zhang, P. L., Sinha, M. K. and Considine, R. V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 348, (9021). 159-61.
- Chace, D. H., Kalas, T. A. and Naylor, E. W. (2003). Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem.* 49, (11). 1797-817.
- Charles, M. A., Pettitt, D. J., Hanson, R. L., Bennett, P. H., Saad, M. F., Liu, Q. Z. and Knowler, W. C. (1994). Familial and metabolic factors related to blood pressure in Pima Indian children. *Am J Epidemiol.* 140, (2). 123-31.
- Choi, Y. H., Hartzell, D., Azain, M. J. and Baile, C. A. (2002). TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol Behav.* 77, (1). 1-4.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 148, (6). 1258-70.
- Conde-Agudelo, A., Papageorgiou, A. T., Kennedy, S. H., Villar, J. (2013). Novel biomarkers for predicting intrauterine growth restriction : a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 120, (6) 681-94.
- Coppari, R. and Bjorbaek, C. (2012). Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 11, (9). 692-708.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C. and Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 312, (5775). 927-30.
- 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., Grit, I., Hulin, P., Randuineau, G. and Parnet, P. (2012). Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. *PLoS One*. 7, (1). e30616.
- Cripps, R. L., Martin-Gronert, M. S. and Ozanne, S. E. (2005). Fetal and perinatal programming of appetite. *Clin Sci (Lond)*. 109, (1). 1-11.

-D-

- Del Prado, M., Delgado, G. and Villalpando, S. (1997). Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr*. 127, (3). 458-62.
- 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., 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.
- Desai, M., Li, T. and Ross, M. G. (2011). Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: neurotrophic effects of leptin and insulin. *Brain Res*. 1378, 29-42.
- Dessi, A., Atzori, L., Noto, A., Visser, G. H., Gazzolo, D., Zanardo, V., Barberini, L., Puddu, M., Ottonello, G., Atzei, A., De Magistris, A., Lussu, M., Murgia, F., Fanos, V. (2011). Metabolomics in newborns with intrauterine growth retardation (IUGR) : urine reveals markers of metabolic syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med. Suppl*. 2. 35-9.
- Dorner, G., Mohnike, A. and Thoenke, H. (1984). Further evidence for the dependence of diabetes prevalence on nutrition in perinatal life. *Exp Clin Endocrinol*. 84, (2). 129-33.
- Dumortier, O., Blondeau, B., Duvillie, B., Reusens, B., Breant, B. and Remacle, C. (2007). Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia*. 50, (12). 2495-503.

-E-

- Eaton, S. (2002). Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res.* 41, (3). 197-239.
- Ebert, D., Haller, R. G. and Walton, M. E. (2003). Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci.* 23, (13). 5928-35.
- Edmond, J. (1992). Energy metabolism in developing brain cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 70 Suppl, S118-29.
- Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A. and De Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res.* 18, (4). 551-61.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H. and Bray, G. A. (1991). Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol.* 260, (2 Pt 2). R328-34.
- Elias, C. F., Lee, C. E., Kelly, J. F., Ahima, R. S., Kuhar, M., Saper, C. B. and Elmquist, J. K. (2001). Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol.* 432, (1). 1-19.
- Elmquist, J. K., Bjorbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S. and Saper, C. B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol.* 395, (4). 535-47.
- Erlanson-Albertsson, C. (2005). How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 97, (2). 61-73.
- Erlanson-Albertsson, C. and York, D. (1997). Enterostatin--a peptide regulating fat intake. *Obes Res.* 5, (4). 360-72.

-F-

- Fantin, V. R., Wang, Q., Lienhard, G. E. and Keller, S. R. (2000). Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278, (1). E127-33.

- Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E., Tatro, J. B., Rand, W. M. and Lechan, R. M. (2000). alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett.* 289, (2). 152-6.
- Fenton, T. R. (2003). A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr.* 3, 13.
- Fernandez-Twinn, D. S. and Ozanne, S. E. (2010). Early life nutrition and metabolic programming. *Ann N Y Acad Sci.* 1212, 78-96.
- Fernandez-Twinn, D. S., Ozanne, S. E., Ekizoglou, S., Doherty, C., James, L., Gusterson, B. and Hales, C. N. (2003). The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr.* 90, (4). 815-22.
- 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.
- Fetissov, S. O., Kopp, J. and Hokfelt, T. (2004). Distribution of NPY receptors in the hypothalamus. *Neuropeptides.* 38, (4). 175-88.
- Fetissov, S. O., Meguid, M. M., Shafiroff, M., Miyata, G. and Torelli, G. F. (2000). Dopamine in the VMN of the hypothalamus is important for diurnal distribution of eating in obese male Zucker rats. *Nutrition.* 16, (1). 65-6.
- Floegel, A., Stefan, N., Yu, Z., Muhlenbruch, K., Drohan, D., Joost, H. G., Fritsche, A., Haring, H. U., Hrabe De Angelis, M., Peters, A., Roden, M., Prehn, C., Wang-Sattler, R., Illig, T., Schulze, M. B., Adamski, J., Boeing, H. and Pischon, T. (2013). Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes.* 62, (2). 639-48.
- Fontaine, C., Dubois, G., Duguay, Y., Helledie, T., Vu-Dac, N., Gervois, P., Soncin, F., Mandrup, S., Fruchart, J. C., Fruchart-Najib, J. and Staels, B. (2003). The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 278, (39). 37672-80.
- Froguel, P., Guy-Grand, B. and Clement, K. (2000). Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome. *Presse Med.* 29, (10). 564-71.
- Froy, O. (2011). The circadian clock and metabolism. *Clin Sci (Lond).* 120, (2). 65-72.

Fruhbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 393, (Pt 1). 7-20.

Fulton, S. (2010). Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol.* 31, (1). 85-103.

-G-

Girault, E. M., Yi, C. X., Fliers, E. and Kalsbeek, A. (2012). Orexins, feeding, and energy balance. *Prog Brain Res.* 198, 47-64.

Goodwin, G. W. and Taegtmeyer, H. (1999). Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol.* 277, (4 Pt 1). E772-7.

Goodwin, G. W. and Taegtmeyer, H. (2000). Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279, (4). H1490-501.

Gouaze, A., Brenachot, X., Rigault, C., Krezymon, A., Rauch, C., Nedelec, E., Lemoine, A., Gascuel, J., Bauer, S., Penicaud, L. and Benani, A. (2013). Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. *PLoS One.* 8, (8). e72029.

Green, M. H., Dohner, E. L. and Green, J. B. (1981). Influence of dietary fat and cholesterol on milk lipids and on cholesterol metabolism in the rat. *J Nutr.* 111, (2). 276-86.

Griffond, B., Risold, P. Y., Jacquemard, C., Colard, C. and Fellmann, D. (1999). Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett.* 262, (2). 77-80.

Grigor, M. R. and Warren, S. M. (1980). Dietary regulation of mammary lipogenesis in lactating rats. *Biochem J.* 188, (1). 61-5.

Guan, H., Arany, E., Van Beek, J. P., Chamson-Reig, A., Thyssen, S., Hill, D. J. and Yang, K. (2005). Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288, (4). E663-73.

Guma, A., Zierath, J. R., Wallberg-Henriksson, H. and Klip, A. (1995). Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 268, (4 Pt 1). E613-22.

Gutt, M., Davis, C. L., Spitzer, S. B., Llabre, M. M., Kumar, M., Czarnecki, E. M., Schneiderman, N., Skyler, J. S. and Marks, J. B. (2000). Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract.* 47, (3). 177-84.

-H-

- 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.
- Hall, B. (1979). Uniformity of human milk. *Am J Clin Nutr.* 32, (2). 304-12.
- Hall, R. K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'brien, R. and Granner, D. K. (2000). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J Biol Chem.* 275, (39). 30169-75.
- Hanson, R. W. and Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem.* 66, 581-611.
- Harder, T., Bergmann, R., Kallischnigg, G. and Plagemann, A. (2005). Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 162, (5). 397-403.
- Harris, R. B. (2000). Leptin--much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr.* 20, 45-75.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B. and Montminy, M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 413, (6852). 179-83.
- Hetherington, A. W. and Ranson, S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec.* 78, 149-172.
- Holness, M. J. and Sugden, M. C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* 31, (Pt 6). 1143-51.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109, (9). 1125-31.

- Hue, L., Maisin, L. and Rider, M. H. (1988). Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle. *Biochem J.* 251, (2). 541-5.
- Hue, L. and Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297, (3). E578-91.
- Hunter, R. G., Philpot, K., Vicentic, A., Dominguez, G., Hubert, G. W. and Kuhar, M. J. (2004). CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 15, (9). 454-9.
- Hwa, J. J., Ghibaudi, L., Gao, J. and Parker, E. M. (2001). Central melanocortin system modulates energy intake and expenditure of obese and lean Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281, (2). R444-51.

-I-

- Ifft, J. D. (1972). An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *J Comp Neurol.* 144, (2). 193-204.

-J-

- 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.

-K-

- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1, (1). 15-25.
- Kahn, C. R. (1994). Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes.* 43, (8). 1066-84.
- Kalra, S. P., Dube, M. G., Sahu, A., Phelps, C. P. and Kalra, P. S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, (23). 10931-5.

- Kappy, M., Sellinger, S. and Raizada, M. (1984). Insulin binding in four regions of the developing rat brain. *J Neurochem.* 42, (1). 198-203.
- Kessler, J. A., Spray, D. C., Saez, J. C. and Bennett, M. V. (1984). Determination of synaptic phenotype: insulin and cAMP independently initiate development of electrotonic coupling between cultured sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, (19). 6235-9.
- Kido, Y., Burks, D. J., Withers, D., Bruning, J. C., Kahn, C. R., White, M. F. and Accili, D. (2000). Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest.* 105, (2). 199-205.
- Kim, D. M., Ahn, C. W. and Nam, S. Y. (2005). Prevalence of obesity in Korea. *Obes Rev.* 6, (2). 117-21.
- Kim, J. Y., Park, J. Y., Kim, O. Y., Ham, B. M., Kim, H. J., Kwon, D. Y., Jang, Y. and Lee, J. H. (2010). Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). *J Proteome Res.* 9, (9). 4368-75.
- Kong, W., Stanley, S., Gardiner, J., Abbott, C., Murphy, K., Seth, A., Connoley, I., Ghatei, M., Stephens, D. and Bloom, S. (2003). A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J.* 17, (12). 1688-90.
- Konner, A. C. and Bruning, J. C. (2012). Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* 16, (2). 144-52.
- Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Backhed, H. K., Gonzalez, A., Werner, J. J., Angenent, L. T., Knight, R., Backhed, F., Isolauri, E., Salminen, S. and Ley, R. E. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell.* 150, (3). 470-80.
- Koshy, T. S., Sara, V. R., King, T. L. and Lazarus, L. (1975). The influence of protein restriction imposed at various stages of pregnancy on fetal and placental development. *Growth.* 39, (4). 497-506.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM: Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:45-56.

-L-

- Lameira, D., Lejeune, S. and Mourad, J. J. (2008). [Metabolic syndrome: epidemiology and its risks]. *Ann Dermatol Venereol.* 135 Suppl 4, S249-53.
- Langhans, W., Leitner, C. and Arnold, M. (2011). Dietary fat sensing via fatty acid oxidation in enterocytes: possible role in the control of eating. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300, (3). R554-65.
- Langley, S. C., Browne, R. F. and Jackson, A. A. (1994). Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol.* 109, (2). 223-9.
- Langley-Evans, S. C., Bellinger, L. and McMullen, S. (2005). Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour. *Matern Child Nutr.* 1, (3). 142-8.
- Lechan, R. M. and Fekete, C. (2006). Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Peptides.* 27, (2). 310-25.
- Lechan, R. M. and Jackson, I. M. (1982). Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology.* 111, (1). 55-65.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J. H., McGarry, J. D. and Unger, R. H. (1994). Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, (23). 10878-82.
- Leger, J., Noel, M., Limal, J. M. and Czernichow, P. (1996). Growth factors and intrauterine growth retardation. II. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein 3 levels in children with intrauterine growth retardation compared with normal control subjects: prospective study from birth to two years of age. Study Group of IUGR. *Pediatr Res.* 40, (1). 101-7.
- Leitner, Y., Fattal-Valevski, A., Geva, R., Eshel, R., Toledano-Alhadeef, H., Rotstein, M., Bassan, H., Radianu, B., Bitchonsky, O., Jaffa, A. J. and Harel, S. (2007). Neurodevelopmental outcome of children with intrauterine growth retardation: a longitudinal, 10-year prospective study. *J Child Neurol.* 22, (5). 580-7.

- Lesage, J., Blondeau, B., Grino, M., Breant, B. and Dupouy, J. P. (2001). Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*. 142, (5). 1692-702.
- Levin, B. E., Routh, V. H., Kang, L., Sanders, N. M. and Dunn-Meynell, A. A. (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes*. 53, (10). 2521-8.
- Lin, L., Park, M. and York, D. A. (2007). Enterostatin inhibition of dietary fat intake is modulated through the melanocortin system. *Peptides*. 28, (3). 643-9.
- Lin, L. and York, D. A. (2005). 5-HT1B receptors modulate the feeding inhibitory effects of enterostatin. *Brain Res*. 1062, (1-2). 26-31.
- Lin, S., Storlien, L. H. and Huang, X. F. (2000). Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res*. 875, (1-2). 89-95.

-M-

- Mains, R. E. and Eipper, B. A. (1979). Synthesis and secretion of corticotropins, melanotropins, and endorphins by rat intermediate pituitary cells. *J Biol Chem*. 254, (16). 7885-94.
- Marty, N., Bady, I. and Thorens, B. (2006). Distinct classes of central GLUT2-dependent sensors control counterregulation and feeding. *Diabetes*. 55, (Suppl.2). S108-S113.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F. and Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28, (7). 412-9.
- Mayes, P. A. and Botham, K. M. (2000). Oxidation of fatty acids : Ketogenesis. In: *Harper's Biochemistry*. McGraw-Hill (Ed), (Eds), New York, NY. Chapitre 22. 180-189.
- Mcgarry, J. D. and Brown, N. F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 244, (1). 1-14.
- Mcgarry, J. D., Mannaerts, G. P. and Foster, D. W. (1977). A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest*. 60, (1). 265-70.
- Mcmillen, I. C., Adam, C. L. and Muhlhausler, B. S. (2005). Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J Physiol*. 565, (Pt 1). 9-17.

- Mcminn, J. E., Baskin, D. G. and Schwartz, M. W. (2000). Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obes Rev.* 1, (1). 37-46.
- Mendoza, J., Pevet, P. and Challet, E. (2008). High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol.* 586, (Pt 24). 5901-10.
- Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., Magnuson, M. A. and Kahn, C. R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell.* 6, (1). 87-97.
- Mihalik, S. J., Michaliszyn, S. F., De Las Heras, J., Bacha, F., Lee, S., Chace, D. H., Dejesus, V. R., Vockley, J. and Arslanian, S. A. (2012). Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: evidence for enhanced mitochondrial oxidation. *Diabetes Care.* 35, (3). 605-11.
- Miller, J. C., Gnaedinger, J. M. and Rapoport, S. I. (1987). Utilization of plasma fatty acid in rat brain: distribution of [¹⁴C]palmitate between oxidative and synthetic pathways. *J Neurochem.* 49, (5). 1507-14.
- Miyazaki, Y. and DeFronzo, R. A. (2009). Visceral fat dominant distribution in male type 2 diabetic patients is closely related to hepatic insulin resistance, irrespective of body type. *Cardiovasc Diabetol.* 8, 44.
- Mizuno, T. M. and Mobbs, C. V. (1999). Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology.* 140, (2). 814-7.
- Moco, S., Collino, S., Rezzi, S. and Martin, F. P. (2013). Metabolomics perspectives in pediatric research. *Pediatr Res.* 73, (4 Pt 2). 570-6.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem.* 219, (3). 713-25.
- Muoio, D. M. and Newgard, C. B. (2008). Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, (3). 193-205.
- Murphy, B., Nunes, C. N., Ronan, J. J., Hanaway, M., Fairhurst, A. M. and Mellin, T. N. (2000). Centrally administered MTII affects feeding, drinking, temperature, and activity in the Sprague-Dawley rat. *J Appl Physiol.* 89, (1). 273-82.

-N-

Nestlé Nutrition Institute Workshop Series Home - Karger Publishers International Nutrition: Achieving Millennium Goals and Beyond. 78th Nestlé Nutrition Institute Workshop, Muscat, March 2013. Editor(s): Black R. (Baltimore, Md.)

Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., Haqq, A. M., Shah, S. H., Arlotto, M., Slentz, C. A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B. R., Yancy, W. S., Jr., Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R. S., Millington, D. S., Butler, M. D. and Svetkey, L. P. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* 9, (4). 311-26.

Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W. and Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 336, (6086). 1262-7.

-O-

ObÉpi. (2012). Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. Editorial: Corinne Le Goff - Présidente Roche SAS. 60 pages.

O'brien, R. M. and Granner, D. K. (1996). Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev.* 76, (4). 1109-61.

Ornoy, A. (2011). Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reprod Toxicol.* 32, (2). 205-12.

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., Dorling, M. W., Wang, C. L. and Nave, B. T. (2001). Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280, (3). E534-9.

Ozanne, S. E., Dorling, M. W., Wang, C. L. and Petry, C. J. (2000). Depot-specific effects of early growth retardation on adipocyte insulin action. *Horm Metab Res.* 32, (2). 71-5.

- Ozanne, S. E., Jensen, C. B., Tingey, K. J., Martin-Gronert, M. S., Grunnet, L., Brons, C., Storgaard, H. and Vaag, A. A. (2006). Decreased protein levels of key insulin signalling molecules in adipose tissue from young men with a low birthweight: potential link to increased risk of diabetes? *Diabetologia*. 49, (12). 2993-9.
- Ozanne, S. E., Jensen, C. B., Tingey, K. J., Storgaard, H., Madsbad, S. and Vaag, A. A. (2005). Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia*. 48, (3). 547-52.
- Ozanne, S. E., Lewis, R., Jennings, B. J. & Hales, C. N. 2004. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin Sci (Lond)*, 106, 141-5.
- 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., 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.
- Ozanne, S. E., Wang, C. L., Coleman, N. and Smith, G. D. (1996). Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol*. 271, (6 Pt 1). E1128-34.

-P-

- Palou, M., Priego, T., Sanchez, J., Torrens, J. M., Palou, A. and Pico, C. (2010). Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology*. 151, (3). 1030-41.
- Parker, R. M. and Herzog, H. (1999). Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci*. 11, (4). 1431-48.
- Peruzzo, B., Pastor, F. E., Blazquez, J. L., Schobitz, K., Pelaez, B., Amat, P. and Rodriguez, E. M. (2000). A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res*. 132, (1). 10-26.
- Pessin, J. E. and Saltiel, A. R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 106, (2). 165-9.

- 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.
- Petry, C. J., Dorling, M. W., Pawlak, D. B., Ozanne, S. E. and Hales, C. N. (2001). Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res*. 2, (2). 139-43.
- Petry, C. J., Ozanne, S. E., Wang, C. L. and Hales, C. N. (2000). Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. *Horm Metab Res*. 32, (6). 233-9.
- Phipps, K., Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H., Osmond, C. and Clark, P. M. (1993). Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia*. 36, (3). 225-8.
- Pilkis, S. J. and Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*. 54, 885-909.
- Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J. M. and Horvath, T. L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. 304, (5667). 110-5.
- Plagemann, A., Harder, T., Kohlhoff, R., Rohde, W. and Dorner, G. (1997). Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 21, (6). 451-6.
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Janert, U., Melchior, K., Rohde, W. and Dorner, G. (1999). Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. *Int J Dev Neurosci*. 17, (1). 37-44.
- 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., Heidrich, I., Gotz, F., Rohde, W. and Dorner, G. (1992). Lifelong enhanced diabetes susceptibility and obesity after temporary intrahypothalamic hyperinsulinism during brain organization. *Exp Clin Endocrinol*. 99, (2). 91-5.
- Poplawski, M. M., Mastaitis, J. W., Yang, X. J. and Mobbs, C. V. (2010). Hypothalamic responses to fasting indicate metabolic reprogramming away from glycolysis toward lipid oxidation. *Endocrinology*. 151, (11). 5206-17.

Pritchard, L. E., Turnbull, A. V. and White, A. (2002). Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol.* 172, (3). 411-21.

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D. and Spiegelman, B. M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature.* 423, (6939). 550-5.

-Q-

Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Mathes, W. F., Przypek, R., Kanarek, R. and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature.* 380, (6571). 243-7.

-R-

Randle, P. J. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 14, (4). 263-83.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. and Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1, (7285). 785-9.

Ravelli, G. P., Stein, Z. A. and Susser, M. W. (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 295, (7). 349-53.

Reusens, B. and Remacle, C. (2006). Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int J Biochem Cell Biol.* 38, (5-6). 913-22.

Reusens, B., Theys, N., Dumortier, O., Goosse, K. and Remacle, C. (2011). Maternal malnutrition programs the endocrine pancreas in progeny. *Am J Clin Nutr.* 94, (6 Suppl). 1824S-1829S.

Richard, D., Huang, Q. and Timofeeva, E. (2000). The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24 Suppl 2, S36-9.

- Rolls, B. A., Gurr, M. I., Van Duijvenvoorde, P. M., Rolls, B. J. and Rowe, E. A. (1986). Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. *Physiol Behav.* 38, (2). 185-90.
- Rosenberg, A. (2008). The IUGR newborn. *Semin Perinatol.* 32, (3). 219-24.

-S-

- Saini, V. (2010). Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 1, (3). 68-75.
- Salek, R. M., Maguire, M. L., Bentley, E., Rubtsov, D. V., Hough, T., Cheeseman, M., Nunez, D., Sweatman, B. C., Haselden, J. N., Cox, R. D., Connor, S. C. and Griffin, J. L. (2007). A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol Genomics.* 29, (2). 99-108.
- Saltiel, A. R. (2001). New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell.* 104, (4). 517-29.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414, (6865). 799-806.
- Sanchez-Castillo, C. P., Velasquez-Monroy, O., Lara-Esqueda, A., Berber, A., Sepulveda, J., Tapia-Conyer, R. and James, W. P. (2005). Diabetes and hypertension increases in a society with abdominal obesity: results of the Mexican National Health Survey 2000. *Public Health Nutr.* 8, (1). 53-60.
- Scharrer, E. and Langhans, W. (1986). Control of food intake by fatty acid oxidation. *Am J Physiol.* 250, (6 Pt 2). R1003-6.
- Schechter, R., Abboud, M. and Johnson, G. (1999). Brain endogenous insulin effects on neurite growth within fetal rat neuron cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res.* 116, (2). 159-67.
- Schibler, U., Ripperger, J. and Brown, S. A. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms.* 18, (3). 250-60.
- Schmoll, D., Walker, K. S., Alessi, D. R., Grempler, R., Burchell, A., Guo, S., Walther, R. and Unterman, T. G. (2000). Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem.* 275, (46). 36324-33.

- Schoeller, D. A., Cella, L. K., Sinha, M. K. and Caro, J. F. (1997). Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest.* 100, (7). 1882-7.
- Schooneman, M. G., Vaz, F. M., Houten, S. M. and Soeters, M. R. (2013). Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes.* 62, (1). 1-8.
- Schwartz, M. W., Bergman, R. N., Kahn, S. E., Taborsky, G. J., Jr., Fisher, L. D., Sipols, A. J., Woods, S. C., Steil, G. M. and Porte, D., Jr. (1991). Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *J Clin Invest.* 88, (4). 1272-81.
- Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C. and Porte, D., Jr. (1992). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev.* 13, (3). 387-414.
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Campfield, L. A., Burn, P. and Baskin, D. G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 98, (5). 1101-6.
- Sener, A. and Malaisse, W. J. (1980). L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature.* 288, (5787). 187-9.
- Shah, S. H., Svetkey, L. P. and Newgard, C. B. (2011). Branching out for detection of type 2 diabetes. *Cell Metab.* 13, (5). 491-2.
- Shaham, O., Wei, R., Wang, T. J., Ricciardi, C., Lewis, G. D., Vasan, R. S., Carr, S. A., Thadhani, R., Gerszten, R. E. and Mootha, V. K. (2008). Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Mol Syst Biol.* 4, 214.
- Shepherd, P. R., Crowther, N. J., Desai, M., Hales, C. N. and Ozanne, S. E. (1997). Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr.* 78, (1). 121-9.
- Shimba, S., Ishii, N., Ohta, Y., Ohno, T., Watabe, Y., Hayashi, M., Wada, T., Aoyagi, T. and Tezuka, M. (2005). Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, (34). 12071-6.
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell.* 6, (1). 77-86.
- Sibley, C. P., Turner, M. A., Cetin, I., Ayuk, P., Boyd, C. A., D'souza, S. W., Glazier, J. D., Greenwood, S. L., Jansson, T. and Powell, T. (2005). Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res.* 58, (5). 827-32.

- Sim, K. G., Carpenter, K., Hammond, J., Christodoulou, J. and Wilcken, B. (2002). Acylcarnitine profiles in fibroblasts from patients with respiratory chain defects can resemble those from patients with mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Metabolism*. 51, (3). 366-71.
- Simmons, R. A. (2007). Developmental origins of beta-cell failure in type 2 diabetes: the role of epigenetic mechanisms. *Pediatr Res*. 61, (5 Pt 2). 64R-67R.
- Simmons, R. A., Suponitsky-Kroyter, I. and Selak, M. A. (2005). Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure. *J Biol Chem*. 280, (31). 28785-91.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P. and Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 18, (2). 175-89.
- Smith, S. M., Vaughan, J. M., Donaldson, C. J., Rivier, J., Li, C., Chen, A. and Vale, W. W. (2004). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism. *Endocrinology*. 145, (11). 5202-9.
- 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.
- Sparre, T., Reusens, B., Cherif, H., Larsen, M. R., Roepstorff, P., Fey, S. J., Mose Larsen, P., Remacle, C. and Nerup, J. (2003). Intrauterine programming of fetal islet gene expression in rats--effects of maternal protein restriction during gestation revealed by proteome analysis. *Diabetologia*. 46, (11). 1497-511.
- Stanley, B. G., Kyrkouli, S. E., Lampert, S. and Leibowitz, S. F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*. 7, (6). 1189-92.
- Stanley, S. A., Small, C. J., Murphy, K. G., Rayes, E., Abbott, C. R., Seal, L. J., Morgan, D. G., Sunter, D., Dakin, C. L., Kim, M. S., Hunter, R., Kuhar, M., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. (2001). Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res*. 893, (1-2). 186-94.
- Staub, F., Winkler, A., Peters, J., Goerke, U., Kempfski, O. and Baethmann, A. (1995). Clearance and metabolism of arachidonic acid by C6 glioma cells and astrocytes. *Neurochem Res*. 20, (12). 1449-56.
- Stipanuk, M. H. (2006). *Biochemical, physiology & Molecular aspects of human nutrition*. Eds, E. Saunders. 2ème édition,

- Stocker, C. J., Wargent, E. T., Martin-Gronert, M. S., Cripps, R. L., O'dowd, J. F., Zaibi, M. S., Cottrell, E. C., Mercer, J. G., Duncan, J. S., Cawthorne, M. A., Ozanne, S. E. and Arch, J. R. (2012). Leanness in postnatally nutritionally programmed rats is associated with increased sensitivity to leptin and a melanocortin receptor agonist and decreased sensitivity to neuropeptide Y. *Int J Obes (Lond)*. 36, (8). 1040-6.
- Straus, D. S., Ooi, G. T., Orlowski, C. C. and Rechler, M. M. (1991). Expression of the genes for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins-1 and -2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology*. 128, (1). 518-25.
- Stutz, A. M., Morrison, C. D. and Argyropoulos, G. (2005). The agouti-related protein and its role in energy homeostasis. *Peptides*. 26, (10). 1771-81.
- Sugden, M. C. and Holness, M. J. (2003). Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284, (5). E855-62.
- Sutherland, C., O'brien, R. M. and Granner, D. K. (1996). New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 351, (1336). 191-9.
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J. and Vale, W. W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 36, (3). 165-86.
- Symonds, M. E., Sebert, S. P., Hyatt, M. A. and Budge, H. (2009). Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol*. 5, (11). 604-10.

-T-

- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S. and Et Al. (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*. 372, (6502). 182-6.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. and Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7, (2). 85-96.
- Tarry-Adkins, J. L., Chen, J. H., Jones, R. H., Smith, N. H. and Ozanne, S. E. (2010). Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity,

- and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. *FASEB J.* 24, (8). 2762-71.
- Tarry-Adkins, J. L., Chen, J. H., Smith, N. S., Jones, R. H., Cherif, H. and Ozanne, S. E. (2009). Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to telomere shortening and increased markers of cell senescence in rat islets. *FASEB J.* 23, (5). 1521-8.
- Theys, N., Ahn, M. T., Bouckennooghe, T., Reusens, B. and Remacle, C. (2011). Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *J Nutr Biochem.* 22, (10). 985-94.
- Toran-Allerand, C. D., Ellis, L. and Pfenninger, K. H. (1988). Estrogen and insulin synergism in neurite growth enhancement in vitro: mediation of steroid effects by interactions with growth factors? *Brain Res.* 469, (1-2). 87-100.
- Toste, F. P., De Moura, E. G., Lisboa, P. C., Fagundes, A. T., De Oliveira, E. and Passos, M. C. (2006). Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr.* 95, (4). 830-7.
- Tremaroli, V. and Backhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 489, (7415). 242-9.
- Tsujino, N. and Sakurai, T. (2009). Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev.* 61, (2). 162-76.

-U-

- Unger, R. H. (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes.* 44, (8). 863-70.
- Unicef. (2008). December. Maternal and Newborn Health. Eds, *The State of the World's Children 2009 : Executive Summary*. UNICEF, ISBN : 978-92-806-4321-3. 47 pages.

-V-

- Van Den Pol, A. N., Acuna-Goycolea, C., Clark, K. R. and Ghosh, P. K. (2004). Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron.* 42, (4). 635-52.

- Van Der Sande, M. A., Ceesay, S. M., Milligan, P. J., Nyan, O. A., Banya, W. A., Prentice, A., Mcadam, K. P. and Walraven, G. E. (2001). Obesity and undernutrition and cardiovascular risk factors in rural and urban Gambian communities. *Am J Public Health*. 91, (10). 1641-4.
- Varela, L. and Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep*. 13, (12). 1079-86.
- Vicentic, A. and Jones, D. C. (2007). The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *J Pharmacol Exp Ther*. 320, (2). 499-506.
- Vickers, M. H., Gluckman, P. D., Coveny, A. H., Hofman, P. L., Cutfield, W. S., Gertler, A., Breier, B. H. and Harris, M. (2005). Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*. 146, (10). 4211-6.
- Vo, T. X., Revesz, A., Sohi, G., Ma, N. and Hardy, D. B. (2013). Maternal protein restriction leads to enhanced hepatic gluconeogenic gene expression in adult male rat offspring due to impaired expression of the liver X receptor. *J Endocrinol*. 218, (1). 85-97.
- Von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 27, (7). 339-44.
- Vucetic, Z., Kimmel, J. and Reyes, T. M. (2011). Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of mu-opioid receptor in the brain. *Neuropsychopharmacology*. 36, (6). 1199-206.
- Vucetic, Z., Kimmel, J., Totoki, K., Hollenbeck, E. and Reyes, T. M. (2010). Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology*. 151, (10). 4756-64.

-W-

- Wakil, S. J. and Abu-Elheiga, L. A. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res*. 50 Suppl, S138-43.
- Wang, C., Billington, C. J., Levine, A. S. and Kotz, C. M. (2000). Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport*. 11, (14). 3251-5.

- Warner, M. J. and Ozanne, S. E. (2010). Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J.* 427, (3). 333-47.
- 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 Michels, K. B. (2007). Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr.* 27, 363-88.
- Weiss, P. A., Scholz, H. S., Haas, J. and Tamussino, K. F. (2001). Effect of fetal hyperinsulinism on oral glucose tolerance test results in patients with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 184, (3). 470-5.
- Whitaker, K. W., Totoki, K. and Reyes, T. M. (2012). Metabolic adaptations to early life protein restriction differ by offspring sex and post-weaning diet in the mouse. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 22, (12). 1067-74.
- White, M. F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283, (3). E413-22.
- White, M. F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science.* 302, (5651). 1710-1.
- White, M. F., Shoelson, S. E., Keutmann, H. and Kahn, C. R. (1988). A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem.* 263, (6). 2969-80.
- WHO. World Health Organization. International Travel and Health 2012: Situation as on 1 January 2012.
- Williams, G., Cai, X. J., Elliott, J. C. and Harrold, J. A. (2004). Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav.* 81, (2). 211-22.
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S. and White, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 391, (6670). 900-4.
- Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E. and Stoffel, M. (2003). Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, (20). 11624-9.
- Woods, S. C., Schwartz, M. W., Baskin, D. G. and Seeley, R. J. (2000). Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol.* 51, 255-77.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Baskin, D. G. and Schwartz, M. W. (2003). Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des.* 9, (10). 795-800.
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B. and Bloom, S. (2005). Appetite control. *J Endocrinol.* 184, (2). 291-318.

-Y-

- Yang, X. J., Mastaitis, J., Mizuno, T. and Mobbs, C. V. (2007). Glucokinase regulates reproductive function, glucocorticoid secretion, food intake, and hypothalamic gene expression. *Endocrinology*. 148, (4). 1928-32.
- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura, M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y. and Fujii, S. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*. 1, (6). 371-8.

-Z-

- 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.
- Zambrano, E., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Guzman, C., Garcia-Becerra, R., Boeck, L., Diaz, L., Menjivar, M., Larrea, F. and Nathanielsz, P. W. (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol*. 563, (Pt 1). 275-84.
- Zammit, V. A. (1994). Regulation of ketone body metabolism. A cellular perspective. *Diab Rev*. 2, 132-155.
- Zhang, T., Guan, H., Arany, E., Hill, D. J. and Yang, K. (2007). Maternal protein restriction permanently programs adipocyte growth and development in adult male rat offspring. *J Cell Biochem*. 101, (2). 381-8.
- Zhao, X., Fritsche, J., Wang, J., Chen, J., Rittig, K., Schmitt-Kopplin, P., Fritsche, A., Haring, H. U., Schleicher, E. D., Xu, G. and Lehmann, R. (2010). Metabonomic fingerprints of fasting plasma and spot urine reveal human pre-diabetic metabolic traits. *Metabolomics*. 6, (3). 362-374.
- Zhao, X., Peter, A., Fritsche, J., Elcnerova, M., Fritsche, A., Haring, H. U., Schleicher, E. D., Xu, G. and Lehmann, R. (2009). Changes of the plasma metabolome during an oral

- glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296, (2). E384-93.
- Zheng, H. and Berthoud, H. R. (2008). Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology (Bethesda)*. 23, 75-83.
- Ziegler, E. E. (2007). Adverse effects of cow's milk in infants. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 60, 185-96; discussion 196-9.
- Zvonic, S., Ptitsyn, A. A., Conrad, S. A., Scott, L. K., Floyd, Z. E., Kilroy, G., Wu, X., Goh, B. C., Mynatt, R. L. and Gimble, J. M. (2006). Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes.* 55, (4). 962-70.

Annexe

Annexe 1- Liste des métabolites annotés au niveau plasmatique dans l'étude 4 sur des rats de 16 jours soumis à une empreinte métabolique nutritionnelle périnatale

Table 1. List of plasma metabolites identified by the HPLC-HRMS based metabolomic phenotyping approach, ordered by metabolic pathway and discriminating 16-day-old CC, RC, RR and CR pups.

Pathway	Metabolites	[mz/RT]	RC vs CC ratio	RR vs CC ratio	CR vs CC ratio	RC vs RR ratio	CR vs RR ratio	RC vs CR ratio
Ketogenic and/or gluconeogenic amino acids	Lysine ^{a, b}	M147T37	1.15	1.00	0.57**	1.55	0.76	2.05**
BCAA	Isoleucine/Leucine ^{a, b}	M132T62	0.93	0.75**	0.69**	1.24*	0.92	1.35*
	Tyrosine ^{a, b}	M182T55	0.85	0.74**	0.64**	1.15	0.86	1.33**
	Phenylalanine ^{a, b}	M166T100	1.09	0.73*	0.71	1.49\$\$	0.97	1.52**
	Aspartic acid ^{a, b}	M132T39	1.11	1.29	1.16	0.86	0.90	0.93
	Glutamate ^{a, b}	M146T45	0.86	1.09	1.00	0.79	0.91	0.86
	Histidine ^{a, b}	M156T40	0.76	1.98	4.66***	0.38	2.35**	0.16***
	Threonine/Homoserine ^{a, b}	M120T99	1.23	0.73	0.72**	1.50**	0.98	1.71**
Tryptophan pathway	Tryptophan ^{a, b}	M205T392	1.28	0.64*	0.75	1.99*	1.17	1.70*
	Kynurenine ^{a, b}	M209T101	0.91	0.61**	0.66*	1.49*	1.08	1.38*
Arginine & proline metabolism	Arginine ^{a, b}	M175T35	1.06	1.05	1.32	1.00	1.25	0.81
	Homoarginine ^{a, b}	M189T44	0.79	0.92	0.69	0.86	0.75	1.14
	Ornithine ^{a, b}	M133T36	1.12	0.88	0.76*	1.27	0.86	1.47**
	Proline ^{a, b}	M116T46	0.93	1.00	0.64**	0.94	0.64*	1.44*
	Creatinine ^{a, b}	M114T45	0.96	0.91	0.90	1.06	1.00	1.06
	N-acetylglutamate ^a	M190T48	0.77	0.89	0.65	0.86	0.73	1.18
	Ornithine ^{a, b}	M133T36	1.12	0.88	0.76*	1.27	0.86	1.47**

Pathway	Metabolites	[mz/RT]	RC vs CC ratio	RR vs CC ratio	CR vs CC ratio	RC vs RR ratio	CR vs RR ratio	RC vs CR ratio
Glutathion metabolism	Methionine ^{a, b}	M150T54	1.07	0.71**	0.70**	1.50**	0.99	1.52**
	Taurine ^{a, b}	M126T42	1.07	0.96	1.17	1.12	1.22	0.92
	Betaine ^{a, b}	M118T47	0.96	0.74**	0.77*	1.31*	1.04	1.25*
	Glycine ^{a, b}	M75T51	0.55	2.02	1.39	0.27	0.69	0.39
Glutamyl amino acids	Gamma-Glutamyltyrosine ^a	M311T96	0.72*	0.51**	0.50***	1.40*	1.03	1.44**
	Glutamylphenylalanine ^a	M295T322	0.96	0.48***	0.47***	2.03***	0.99	2.03***
	Gamma-glutamylcysteine ^a	M251T35	1.05	0.73*	0.67*	1.45**	0.92	1.57*
	Gamma-glutamyl-isoleucine	M261T250	0.81*	0.55***	0.59***	1.48*	1.07	1.37*
Transmethylation	NG-dimethyl-L-Arginine ^a	M203T45	0.92	0.69***	0.65***	1.34**	0.95	1.42**
Nicotinamide metabolism	Nicotinic acid ^{a, b}	M124T35	0.99	0.95	1.13	1.04	1.19	0.88
	Nicotinamide ^{a, b}	M123T68	1.03	0.79*	0.84	1.30	1.07	1.22
	Nicotinamide N-oxide ^{a, b}	M139T48	1.34	1.11	0.82	1.20	0.74	1.62
Purine and pyrimidine pathway	Cytosine ^{a, b}	M112T53	0.91	0.75*	0.87	1.19	1.14	1.04
	2-Deoxycytidine ^{a, b}	M228T54	0.90	0.77*	0.82	1.16	1.07	1.09
	Cytosine ^{a, b}	M112T53	0.90	0.83*	0.89*	1.08	1.06	1.01
	Cytidine ^{a, b}	M244T53	0.86	0.37***	0.58**	2.30**	1.56*	1.47*
	Cytidine 5-monophosphate ^{a, b}	M324T42	1.18	0.78	0.79	1.52***	1.01	1.50**
	Hypoxanthine ^{a, b}	M137T57	0.82	0.76	0.64	1.08	0.84	1.28
	5-methylcytidine ^{a, b}	M258T56	0.94	0.76**	0.85	1.23*	1.12	1.10
	adenosine-5-monophosphate ^{a, b}	M348T63	1.05	0.98	1.03	1.07	1.05	1.02
Krebs cycle	Pyruvic acid ^{a, b}	M87T45	0.79	1.33	1.00	0.59*	0.75	0.79
	Citric acid ^{a, b}	M191T51	0.86	0.92	0.61**	1.07	0.66*	1.40**
Lipid metabolic pathways	carnitine ^{a, b}	M162T45	1.17	1.30**	1.16	0.90	0.89	1.01
	O-acetyl-carnitine (C2) ^{a, b}	M204T50	0.88	1.24*	1.28*	0.71**	1.03	0.68**
	3-hydroxy-isovaleryl carnitine (C5) ^b	M262T109	0.99	0.74*	0.94	1.33	1.26	1.06

	Hexanoylcarnitine (C4) ^a	M260T501	0.81*	0.88	1.04	0.92	1.19	0.78
	L-Octanoylcarnitine ^a	M288T622	0.78*	0.68*	0.97	1.15	1.44	0.80
	Isobutyric acid ^{a, b}	M89T107	1.72**	1.07	0.47***	1.60**	0.43***	3.69***
	2-amino-octanoic acid ^{a, b}	M158T382	0.94	1.16	2.06**	0.81	1.78*	0.46**
	D,L-pantothenic acid ^{a, b}	M220T152	0.93	1.00	1.04	0.93	1.03	0.90
	2-amino-octanoic acid ^{a, b}	M160T383	0.77	1.19	1.58*	0.64	1.33	0.48**
	Myoinositol ^{a, b}	M203T39	0.97	0.97	1.15	1.00	1.18	0.85*
Bile acids	Taurocholic acid ^{a, b}	M516T519	1.89**	0.49*	0.71	3.82***	1.44	2.65***
		M593T702	1.35	0.18**	1.14	7.46**	6.33*	1.18
	Mesobilirubinogen ^a							
Vitamin	Thiamine (vitamine B1) ^{a, b}	M265T51	0.97	0.74**	0.79**	1.32**	1.07	1.23**
	Riboflavine ^{a, b}	M377T410	1.01	0.56**	0.87	1.80***	1.48*	1.21*
Diverse	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine ^a	M265T51	1.03	0.74**	0.79**	1.32**	1.07	1.23*
	Mannitol ^{a, b}	M183T55	0.85	0.75**	0.66**	1.13	0.88	1.29**

a Putatively annotated compounds (e.g. without chemical reference standards, based upon physicochemical properties and/or spectral similarity with public/commercial spectral libraries).

b Identified compounds classes (e.g. based upon characteristic physicochemical properties of a chemical reference standards).

Fold with a *, ** or *** are significantly different at 5%, 1% or 0.1%, respectively.

Annexe 2- Article 5:

Use of UPLC-ESI-MS/MS to Quantitate Free Amino Acid Concentrations in Micro-samples of Mammalian Milk

Véronique Ferchaud Roucher, Emmanuelle Desnots, Charlotte Naël, Aurore Martin Agnoux, Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Dominique Darmaun, Clair-Yves Boquien

Publié dans Amino Acid Collection

Use of UPLC-ESI-MS/MS to Quantitate Free Amino Acid Concentrations in Micro-samples of Mammalian Milk

Authors

Véronique Ferchaud Roucher, Emmanuelle Desnots, Charlotte Naël, Aurore Martin Agnoux, Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Dominique Darmaun, Clair-Yves Boquien

A. Martin Agnoux, M.-C. Alexandre-Gouabau, D. Darmaun, C.-Y. Boquien¹

INRA, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, F-44 000 Nantes, France

V. Ferchaud Roucher, E. Desnots, C. Naël, A. Martin Agnoux, M.-C. Alexandre-Gouabau, D. Darmaun, C.-Y. Boquien

CRNH, Human Nutrition Research Center, F-44093, Nantes, France

LUNAM Université, F-44 200 Nantes, France

IMAD, DHU 2020, CHU Hôtel-Dieu, F-44 000 Nantes, France

¹Corresponding author: Clair-Yves.Boquien@univ-nantes.fr

CHU Hôtel Dieu

Etage 1- aile Nord - INRA PHAN

Place Alexis Ricordeau

44093 Nantes cedex 1 - France

Tel 33 (0)2 53 48 20 07

FAX 33 (0)2 53 48 20 03

Keywords: free amino acid, human milk, rat milk, cow milk, UPLC-ESI-MS/MS

ABSTRACT

Although free amino acids (FAA) account for a small fraction of total nitrogen in mammalian milk, they are more abundant in human milk than in most formulas, and may serve as a readily available source of amino acids for protein synthesis, as well as fulfill specific physiologic roles. We used reversed phase Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) technique for FAA profiling in milks from three species (human, rat and cow) with a simple and rapid sample preparation. The derivatization procedure chosen, combined with UPLC-ESI-MS/MS allowed the quantitation of 21 FAA using labeled amino acids (Internal Standards) over a 10 min run time in micro-samples of mammalian milk (50 μ L). The low limit of quantitation was 0.05 pmol/ μ L for most FAA with good repeatability and reproducibility (mean CV of 5.1%). Higher levels of total FAA were found in human (3032 μ M) and rat milk (3460 μ M) than in bovine milk (240 μ M), with wide differences in the abundances of specific FAA between species. This robust analytical method could be applied to monitor FAA profile in human breast milk, and open the way to individualized adjustment of FAA content for the nutritional management of infants.

INTRODUCTION

Due to its many health benefits, breastfeeding is considered the gold standard for feeding infants in the first 6 months of life (Horta et al. 2007). The composition of milk therefore has long been the focus of intense scrutiny in humans as well as other mammalian species (Jensen 1995). Among macronutrients, protein is of key importance since milk protein content largely determines the initial growth rate of the pups. Protein concentration varies by a factor of 10 among mammals, with the lowest content for humans (10 to 11 g/L) (Jensen 1995), an intermediate content for cows (34g/L) (Lindmark-Mansson et al. 2003) and the highest for rodents (80 to 100 g/L) (Grigor et al. 1986), and marine mammals (110 to 130 g/L) (Arnould and Boyd 1995). Across species, the higher the milk protein content, the higher the initial postnatal growth rate (Riek 2008), and the bound amino acid content of milk protein have long been documented both in humans (Yamawaki et al. 2005) and in other species (Lindmark-Mansson et al. 2003).

Besides protein, mammalian milk contains many non-protein nitrogen compounds including urea, ammonia, creatine, creatinine, amines, and free amino acids (FAA). Although, FAA account for only 2% of total nitrogen in human milk (Carratù et al. 2003), they may serve as a source of readily available nitrogen, particularly in the small intestine of preterm infants with limited proteolytic enzymatic activity (Schanler and Garza 1987), and thus impact early postnatal growth. In addition, besides their role as building blocks for protein synthesis, several amino acids have a specific physiologic role, and their availability during the first few weeks of life may be of crucial importance. For instance, adequate dietary taurine availability is required for a normal retinal structure in animals (Imaki et al. 1993), and taurine intake over the first months of life correlates with developmental quotient several years later (Wharton et al. 2004). Accordingly, most infant formulae have been supplemented with taurine to match the needs of babies. Other free amino acids may also be *conditionally essential* in the first few weeks of life: in a porcine model, maternal arginine supplementation was shown to increase sows' milk arginine concentration, and enhance piglet growth (Mateo et al. 2008).

FAA have been already analyzed in human (Agostoni et al. 2000; Atkinson et al. 1980; Chuang et al. 2005; Pamblanco et al. 1989; Sarwar et al. 1998), cow, and other mammalian (Grigor et al. 1986; Sarwar et al. 1998; Wu and Knabe 1994) milks. Yet, to the best of our knowledge, the full FAA profile has not been reported in rats although the mother-reared rat pup model has been the most commonly animal model used in neonatal nutrition. Allowing the determination of the FAA concentrations in rat milk should help nutritionists in the understanding of physiological effects observed in breastfed pups.

Multiple analytical methods have been developed for amino acid quantitation in various biological matrices, including the combination of different techniques of chromatography and various detection systems such as ion exchange chromatography amino acid analyzer (Chuang et al. 2005, Yamawaki et al. 2005,), capillary electrophoresis-fluorescence (Lin CC and Liu CY 2004), LC-UV, LC-fluorescence (Carratù et al. 2003), GC-MS (Namera A et al. 2002, Kaspar et al. 2008), and LC-MS (Dietzen et al. 2008). Two approaches have

been commonly used: direct analysis, and precolumn derivatization methods (Jochum et al. 2006). Although fast and simple, the direct analysis presented insufficient specificity and sensitivity due to the lack of sufficient separation of amino acid in complex biological samples. The use of precolumn derivatization methods improved the sensitivity of amino acid detection but considerably lengthened sample preparation time. Over the last decade, the AccQ.Tag technology was developed using ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) coupled with mass spectrometry, and resulted in improved efficiency, sensitivity, and limit of detection, and shortened the time of analysis of free amino acids, compared with conventional ion exchange techniques (Armenta et al. 2010). Although this analytical method was applied in various biological matrices (Armenta et al. 2010; Salazar et al. 2012) it has never been applied to human milk or other mammalian milks.

The aim of this work was to develop, optimize and validate a micro-assay that would require minimal sample preparation and run time, and that would be suitable for minimal amounts of milk. We used reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) technique for FAA profiling in milks from three species (human, rat and cow) with a simple and rapid sample preparation. The AccQ.Tag derivatization combined with UPLC-ESI-MS/MS offered gains in selectivity and sensitivity using multiple reaction monitoring (MRM) and allowed the quantitation of 21 FAA using labeled amino acid internal standards over a 10 min run time, and in a small volume of mammalian milk (50µL) particularly adapted for rodents, with lower limits of quantitation (LLOQ) at about 0.05µM. This robust analytical method could be applied to monitor FAA profile in human breast milk, and open the way to individualized adjustment of FAA content for the nutritional management of infants.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals And Reagents

Amino acid standards were purchased from Waters (Milford, USA), and L-glutamic acid, L-citrulline, L-glutamine, L-tryptophan, taurine, and L-alanine from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L-[1-¹³C]alanine, L-[2-¹⁵N]tyrosine, L-[2-¹⁵N]glutamic acid, L-[2-¹⁵N]citrulline and L-[¹³C₆]arginine, to serve as internal standards were purchased from Cambridge Isotope Laboratories Inc (Andover, USA), L-[1-¹³C]arginine from Masstrace Inc (Woburn, USA), L-[2-¹⁵N]aspartic acid, L-[2-¹⁵N₃]histidine, L-[2-¹⁵N]serine, L-[2-¹⁵N]threonine, L-[²H₅]tryptophan, [¹⁵N]taurine, L-[2-¹⁵N]glutamine, L-[1-¹³C]glycine, and L-[²H₅]phenylalanine were purchased from Sigma, L-[2-¹⁵N]leucine from Tracer Technologies, inc (Waterloo, Canada), and L-[1-¹³C]valine from Eurisotop (Saint-Aubin, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purifier (Millipore, Eschborn, Germany), UPLC-grade solvents, derivation reagents, and UPLC column were purchased from Waters (Milford, USA), acetonitrile was from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands), hydrochloric acid (HCl) from CARLO ERBA (Val de Rueil, France), and sulfosalicylic acid from Sigma-Aldrich.

Milk Samples

Human milk was obtained from the biocollection that has been established at Nantes University Hospital (Number DC-2009-982). Samples were kept at -80°C from collection until analysis. Eighteen samples were obtained after one month of lactation. Cow's milk was obtained from 4 cows from the same herd by milking them manually at the end of the lactation period (8 months). Rat milk was obtained from an animal study conducted in accordance with the European Communities Council Directive of November 24th 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures and were approved by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Paris, France). Animal facility was approved by the French Veterinary Department and was registered under the number A44276. The experimental protocol was registered under the number CEEA.2011.4. Rat milk was collected as described by Grigor *et al.* (Grigor et al. 1986) at the end of the lactation (18 days). Briefly, pups were removed from their dams for 2 hours before milk was collected. Dams were anesthetized with a mix of isofluran and oxygen, on mats heated during the manipulation, and received an intraperitoneal injection of oxytocin (1 unit of Syntocinon; Sigma-Tau, Ivry-sur-Seine, France) to stimulate milk let-down. After twenty minutes, dams were shaved and disinfected with ethanol, and milk was collected by applying manual pressure to all nipples, until milk flow ceased. Around 0.5 mL of milk was obtained from each animal, and was immediately frozen to -80°C.

Standard Preparation

Standard solutions were prepared for each amino acid in 0.1 M HCl, and stored at -20°C until analysis. A mixture was prepared from 21 natural unlabeled amino acids mixed at relevant concentrations (depending of FAA concentration in milk) to create an unlabeled standard pool solution, and diluted with 0.1 M HCl. A labeled standard pool solution was prepared with 17 labeled amino acids mixed under the same conditions and used as an internal standard. The different points of concentration calibration were prepared by adding increasing amounts of unlabeled standard pool to the labeled internal standard pool reaching concentration ranges from 2.5 to 50 µM for tryptophan, the less concentrated FAA in milk, and from 100 to 2000 µM for glutamic acid, the more concentrated FAA in milk.

Free Amino Acids Extraction

Because of the small sample volume obtained in small rodents, the FAA extraction was optimized for use on a 50 µL sample. Prior to extraction, frozen milk samples were thawed on ice. One hundred microliters of labeled internal standard pool were added into a 200 µL aliquot of each milk sample (human and cow milk). One hundred fifty microliters of ultrapure water and 25 µL of labeled internal standard pool were added to 50 µL of rat milk.

All samples were mixed and defatted by centrifugation at 10 000 g for 15 min at 4°C. The upper (lipid) phase was removed (200 µL), and proteins were precipitated in the aqueous supernatant by adding 20 µL of

a 10% (wt/v) solution of sulfosalicylic acid (SSA) in water, followed by centrifugation at 10 000 g for 15 min at 4°C. The supernatant phase was collected.

AccQ•TagTM Ultra derivatization

FAA were derivatized by adding a mixture of 70 µL of AccQ•TagTM Ultra Borate Buffer (Armenta et al. 2010), 10 µL of supernatant and 20 µL of AccQ•TagTM Ultra reagent (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate), followed by incubation for 10 min at 55°C.

LC-MS/MS Parameters

UPLC Analysis

Liquid chromatographic separation was performed on an Acquity H-Class® UPLC system (Waters Corporation, Milford, USA) equipped with a quaternary solvent manager, an autosampler maintained at 4°C, a Waters AccQ•TagTM Ultra column (2.1 mm x 10 mm, 1.7 µm particles) with a pre-filter heated at 55°C, and coupled with a tandem quadrupole detector. Initial tests were performed with the gradient recommended in the AccQ•Tag UltraTM assay kit for amino acids from Waters developed for UV detection, but the peak resolutions were not sufficient for MS detection. The nonlinear separation gradient used was reported by Armenta *et al.* (2010), and is detailed in Table 1 with a mobile phase flow rate of 0.7 mL/min. One microliter of sample was injected in duplicate into the UPLC system.

Table 1: Gradient elution used for free amino acid analysis (Armenta et al. 2010), Eluent A was 10% AccQ•TagTM Ultra concentrate solvent A in deionized water and eluent B was 100 % AccQ•TagTM Ultra solvent B

Chromatographic gradient program over UPLC-MS/MS analysis time (10 min)			
Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	Flow rate (mL/min)
0	99.9	0.1	0.7
0.54	99.9	0.1	0.7
5.74	90.0	10.0	0.7
7.74	78.8	21.2	0.7
8.04	40.4	59.6	0.7
8.64	40.4	59.6	0.7
8.73	99.9	0.1	0.7
10.00	99.9	0.1	0.7

ESI-MS/MS Analysis

UPLC-MS/MS analysis was carried out on a Xevo TQD® (Waters Corporation, Milford, U.S.A.). We used parameters of detection as detailed by Armenta et al. (2010). The ESI source was operated at 150°C with a desolvation temperature of 450°C, a 900 L/h desolvation gas flow rate and a capillary voltage set at 3.2

kV. The extractor voltage was set at 3.0 V, and the radio frequency voltage at 2.5 V. The cone voltage varied from 27-39 V, depending on the amino acid investigated. Argon was used as the collision gas, and collision energies varied from 19 to 35 eV. Multiple Reaction Monitoring (MRM) was performed in the positive mode. Integration and quantitation were performed using the Waters TargetLinksTM software.

Quantitative Analysis

Calibration curves were constructed by plotting the peak area ratios of unlabeled standard and internal standard (IS) versus the concentration of each amino acid, and used to determine the concentrations of each FAA in milk samples.

Method Validation

The method was validated for linearity and limit of quantitation, recovery, , within- and between-sample repeatability, and reproducibility. The upper and lower limits of detection were determined and defined the domain of linearity of the method. Recovery (expressed as percent of added amount) was determined by the analysis of aliquots of human milk spiked with known amounts of unlabeled FAA. The between-sample repeatability was established by analyzing 10 supernatants obtained by extraction from the same sample of human milk. The within-sample repeatability was determined by repeatedly injecting on the same day the same extract or the same calibration solution into the instrument. Reproducibility was evaluated by having the same milk sample extracted by two different operators, and analyzed 6 times on different days.

RESULTS

Method Performance

The method was optimized and validated for quantification of 21 FAA in every milk tested.

FAA Extraction Optimization

Preliminary experiments were performed to optimize extraction yield and chromatographic profile. Protein precipitation was tested with methanol and SSA (Agostoni et al. 2000; Chuang et al. 2005) with graded volumes of SSA, 20 μ L, 100 μ L, and 200 μ L, and at two different SSA concentrations (10% and 35%). The best peak profiles were observed with 20 μ L of 10% SSA. Milk delipidation was also tested and FAA recovery was similar after milk delipidation. We therefore elected to include the delipidation and deproteinization steps in the procedure in order to inject a sample as pure as possible into the ESI-MS/MS instrument.

Derivatization Optimization

In preliminary experiments graded volumes of AccQ•TagTM Ultra reagent were tested to optimize derivatization. As the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) was in large excess, we

tested a lower volume of reagent. Only 10 μL of AccQ•TagTM Ultra reagent in 80 μL of borate buffer and 10 μL of standard or supernatant milk sample were added, and a comparison was made between three ranges conducted under both conditions (data not shown). The slopes were similar, as were the coefficients of determination. Our ability to detect peaks of aminoquinolyl (AMQ) and di-urea aminoquinolyl (di-AMQ) (high intensity) ensured that reagents were consistently in excess. For all subsequent derivatization, the protocol therefore used 10 μL of AccQ•TagTM Ultra reagent and 80 μL of borate buffer for human and cow milk or 60 μL for rat milk, with resp. 10 μL of supernatant (human/cow milk) or 30 μL of supernatant (rat milk).

ESI- MS/MS Optimization

To optimize the MS/MS parameters and create a MRM method, each derivatized amino acid was first injected by direct infusion into the tandem quadrupole mass spectrometer. In our case, the drift (AQC) largely in excess of the product derivation (AMQ) was found highly concentrated compared to the amounts of amino acids present in sample suggested a strong contamination of the mass analyzer after direct infusion. Transitions of the majority of amino acids are reported by Armenta *et al.* (2010). For other amino acids like glutamine, lysine and cystine, the default setting was used (Table 2), by injecting 25 μM solutions on column. The predominant ions and retention time were detected by MS Scan. Each amino acid produced the same daughter ion ($m/z = 171$), corresponding to the cleavage of ureide bond of the AccQ•Tag adduct in each amino acid derivative. The run time was divided into five segments distributed over the duration of the liquid chromatographic run (Table 2). Fig 1 presents the ion chromatogram obtained from a representative sample of human milk. The dwell time for each amino acid was optimized to obtain sufficient data points for accurate quantitation. The MRM transitions, cone voltages, collision energies, and corresponding internal standards are listed in Table 2.

Fig 1: Ion chromatogram obtained for FAA in human milk (cumulative)

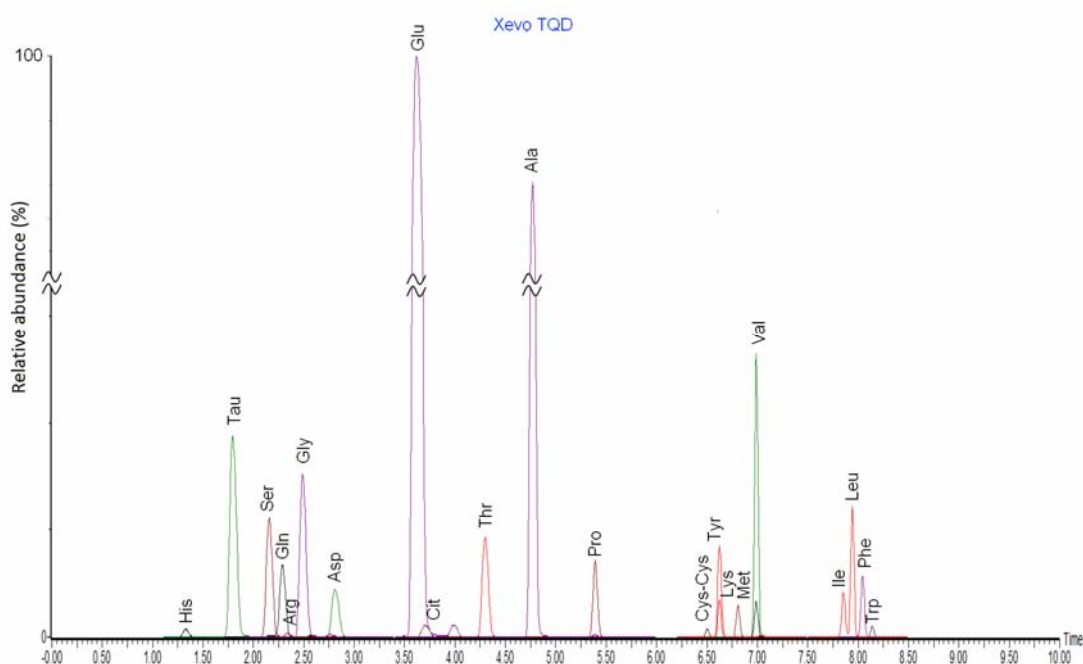


Table 2: ESI-MS/MS conditions for quantitation of FAA in milk

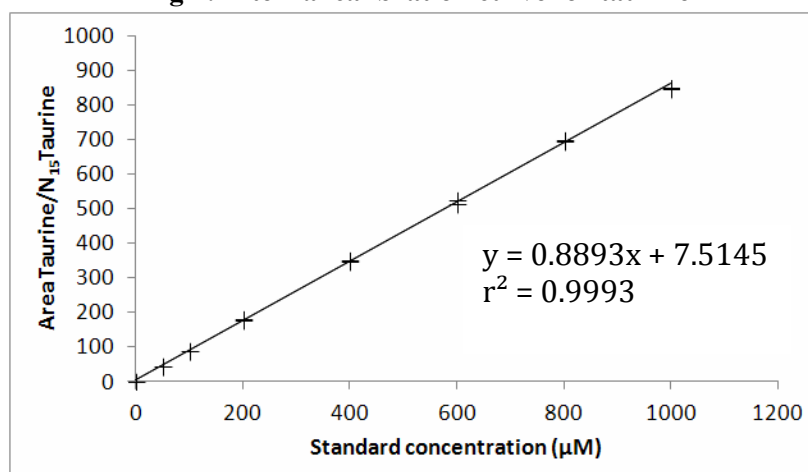
Compound number	Amino acid/ labeled amino acid	MRM transition (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Rt (min)	Function	Window time (min)*	Internal standard
1	L-Histidine	326.21 >171	35	19	1.33	1	1.1 – 2.0	2
2	L-[2- ¹⁵ N ₃]Histidine	329.21>171	35	19	1.33	1	1.1 – 2.0	
3	Taurine	296.11>171	32	24	1.76	1	1.1 – 2.0	4
4	[¹⁵ N]Taurine	297.11>171	32	24	1.76	1	1.1 – 2.0	
5	L-Serine	276.11>171	27	19	2.12	2	1.9 – 3.4	6
6	L-[2- ¹⁵ N]Serine	277.11>171	27	19	2.12	2	1.9 – 3.4	
7	L-Glutamine	317.14>171	35	20	2.26	2	1.9 – 3.4	8
8	L-[2- ¹⁵ N]Glutamine	318.14>171	35	20	2.26	2	1.9 – 3.4	
9	L-Arginine	345.21>171	35	19	2.34	2	1.9 – 3.4	10
10	L-[1- ¹³ C]Arginine	347.21>171	35	19	2.34	2	1.9 – 3.4	
11	Glycine	246.16>171	33	20	2.47	2	1.9– 3.4	12
12	L-[1- ¹³ C]Glycine	247.16>171	33	20	2.47	2	1.9 – 3.4	
13	L-Aspartic acid	304.11>171	32	24	2.78	2	1.9 – 3.4	14
14	L-[2- ¹⁵ N]Aspartic Acid	305.11>171	32	24	2.78	2	1.9 – 3.4	
15	L-Glutamic acid	318.11>171	32	24	3.62	3	3.4 – 6.0	16
16	L-[2- ¹⁵ N]Glutamic Acid	319.11>171	32	24	3.62	3	3.4 – 6.0	
17	L-Citrulline	346.21>171	32	24	3.72	3	3.4 – 6.0	18
18	L-[2- ¹⁵ N]Citrulline	347.21>171	32	24	3.72	3	3.4 – 6.0	
19	L-Threonine	291.11>171	31	22	4.30	3	3.4 – 6.0	20
20	L-[2- ¹⁵ N]Thréonine	291.11>171	31	22	4.30	3	3.4 – 6.0	
21	L-Alanine	260.00>171	32	25	4.76	3	3.4 – 6.0	22
22	L-[1- ¹³ C]Alanine	261.00>171	32	25	4.76	3	3.4 – 6.0	
23	L-Proline	286.16>171	29	21	5.37	3	3.4 – 6.0	22
24	L-Cystine	291.18>171	32	24	6.50	4	6.2 – 7.5	31
25	L-Tyrosine	352.21>171	32	24	6.61	4	6.2 – 7.5	26
26	L-[2- ¹⁵ N]Tyrosine	353.21>171	32	24	6.61	4	6.2 – 7.5	
27	L-Lysine	487.11>171	32	24	6.63	4	6.2 – 7.5	28
28	L-[¹³ C ₆]Lysine	493.23>171	32	24	6.63	4	6.2 – 7.5	
29	L-Methionine	320.21>171	32	24	6.80	4	6.2 – 7.5	31
30	L-Valine	288.23>171	35	24	6.98	4	6.2 – 7.5	31
31	L-[1- ¹³ C]Valine	289.23>171	35	24	6.98	4	6.2 – 7.5	
32	L-Isoleucine	302.20>171	39	35	7.85	5	7.5 – 8.5	34
33	L-Leucine	302.20>171	39	35	7.94	5	7.5 – 8.5	34
34	L-[2- ¹⁵ N]Leucine	303.20>171	39	35	7.94	5	7.5 – 8.5	
35	L-[2H5]Phenylalanine	341.21>171	32	24	8.01	5	7.5 – 8.5	
36	L-Phenylalanine	336.21>171	32	24	8.04	5	7.5 – 8.5	35
37	L-[² H ₅]Tryptophan	380.23>171	32	24	8.10	5	7.5 – 8.5	
38	L-Tryptophan	375.23>171	32	24	8.13	5	7.5 – 8.5	37

*Note: Before 1.10 min and after 8.50 min the flow state was in waste.

Method Validation.

A pool of standard solutions containing 21 amino acids and 17 internal standards was prepared and diluted with 0.1N HCl to appropriate concentrations. Two replicates of a diluted solution aliquot were injected into the instrument to determine the limits of quantitation and the dynamic range of the method. Results are presented in Table 3, and an example of calibration curve obtained for taurine is given in Fig 2. The R² value of the regression analysis over the linear range exceeded 0.99 for all FAA. The LLOQ was 0.05 pmol/μL for most FAA corresponding to a limit of detection (LOD) of 15 fmol/μL.

Fig 2: Internal calibration curve for taurine



For all amino acids tested, the recoveries calculated by adding known amounts of natural amino acids to aliquots of human milk, exceeded 95%. In milk, regarding within-sample repeatability, the mean coefficients of variation (CV %) obtained were 1.6%, and ranged between 0.2% (for taurine) and 4.2% (for arginine). As for the between-sample repeatability, the mean CV was 2.2% and ranged between 0.6% (for glutamic acid) and 4.5% (for arginine), except for lysine and cystine (5.6%). Regarding reproducibility, the mean CV was 5.1%. All CV obtained for reproducibility are presented in Table 3.

Application To Human And Mammalian Milk Analysis.

Mean concentrations for 21 FAA for human, bovine and rat mature milks are reported in Table 4. The LOQ determined in human milk samples were within 0.75-3 μM corresponding to a LOD within 0.2-0.9 μM. Higher levels of total FAA were found in human milk (3032 μM), and rat milk (3460 μM), compared with bovine milk (240 μM). Because of the conversion of glutamine to glutamic acid, the sum of both concentrations was calculated and is annotated as Glx in the text. Glx was by far the most abundant FAA (1861 μM) of human milk, accounting for about 61% of the total FAA, followed by taurine (311 μM) (10%), and alanine (226 μM) (7.5%). For all analyzed samples of breast milk, the sum of glutamine and glutamic acid correlates well ($R^2 = 0.97$) with the sum of FAA (Fig 3). Glx was the most abundant FAA in bovine milk as well (136 μM), accounting for about 56% of the total FAA, followed by several amino acids at very similar levels representing only 5-8% of total FAAs (lysine (20 μM), alanine (15 μM), glycine and proline (13 μM)). The most abundant FAA in rat milk clearly was alanine (679 μM) (20%), followed by proline (424 μM) (12%), and Glx (413.5 μM) (12%). The essential amino acids (EAA) and the amino acids considered conditionally essential for human newborns (Arg, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val) had low concentrations in breast milk, compared with non essential amino acids (EAA/NEAA of 10%), whereas essential amino acids represented a higher proportion of total amino acids in rat milk (with an EAA/NEAA ratio of 42%). Sulfur amino acids (Tau, Cys, Met) represented between 3.9% and 11.7% of total amount of FAA in the milk of the three species tested.

Table 3: Calibration data, dynamic range and human milk reproducibility of FAA (n=6)

Free amino acid	Linear	Dynamic range	CV (%) ^b
	regression data		
	r^2	$\mu\text{mol}/\mu\text{L}^a$	
L-Histidine	0.9998	0.10 – 133.3	2.8
Taurine	0.9993	0.05 – 100	1.8
L-Serine	0.9994	0.05 – 26.7	2.3
L-Glutamine	0.9982	0.05 – 100	8.3
L-Arginine	0.9956	0.1 – 6.7	10.0
Glycine	0.9991	0.05 – 26.7	2.3
L-Aspartic acid	0.9980	0.05 – 26.7	2.9
L-Glutamic acid	0.9986	0.05 – 200	1.6
L-Citrulline	0.9974	0.05 – 5	8.6
L-Threonine	0.9990	0.05 – 26.7	2.8
L-Alanine	0.9953	0.05 – 53.3	2.2
L-Proline	0.9984	0.2 – 53.3	7.1
L-Cystine	0.9948	0.05 – 53.3	15.5
L-Tyrosine	0.9958	0.05 – 26.7	2.7
L-Lysine	0.9954	0.1 – 6.7	8.5
L-Methionine	0.9973	0.05 – 26.7	2.7
L-Valine	0.9973	0.05 – 26.7	2.5
L-Isoleucine	0.9947	0.05 – 13.3	4.4
L-Leucine	0.9968	0.05 – 13.3	2.9
L-Phenylalanine	0.9982	0.05 – 26.7	7.0
L-Tryptophan	0.9986	0.05 – 5	7.5

^a: assay concentration of AQC amino acid derivatives, 1 μL injected

^b: coefficient variation of reproducibility, calculated on 6 independent milk sample preparation tested on 2 days with 2 operators

Fig 3: Correlation between the total glutamic acid and glutamine (Glx) concentration and total FAA concentration in human milk samples ($R^2=0.95$)

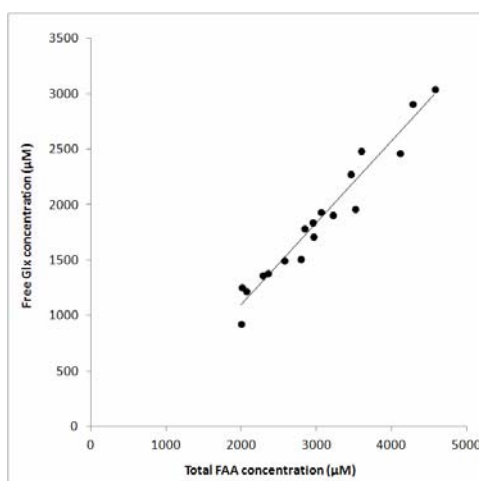


Table 4: FAA in human milk (at 1 month of lactation), cow milk, and rat milk (Values are reported as means, standard deviation, minimum and maximum)

Free amino acids μmol/L	Human milk (n=16)				Rat milk (n=8)				Cow milk (n=4)			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Alanine	225.9	73.4	123.1	385.1	679.0	239.8	261.8	990.9	11.8	10.7	0.8	26.2
Arginine	19.5	12.4	1.5	42.8	53.8	34.0	14.1	119.1	10.7	4.9	3.8	15.4
Aspartic Acid	68.8	36.1	23.2	146.7	225.7	47.7	171.0	320.1	5.4	5.5	0.8	12.3
Citrulline	7.1	3.2	1.9	13.6	42.5	21.4	9.3	68.7	<LOQ	-	-	-
Cysteine+cystine	21.0	8.7	11.2	43.0	33.1	21.3	4.2	64.2	<LOQ	-	-	-
Glx	1,860.7	586.2	926.0	3,040.4	413.5	102.2	212.4	528.0	136.2	64.5	58.9	216.5
Glycine	112.7	37.3	61.4	202.2	133.4	58.8	38.1	195.6	13.0	5.9	4.7	17.6
Histidine	31.4	14.3	12.4	67.5	39.6	19.6	10.8	69.3	2.6	1.6	0.5	4.4
Isoleucine	10.0	6.9	1.0	27.0	26.2	16.0	7.5	53.1	2.0	0.9	0.8	2.7
Leucine	30.0	12.3	12.7	60.6	59.8	33.1	18.9	114.8	2.3	1.3	0.8	3.8
Lysine	33.0	21.6	5.8	84.6	316.0	168.6	45.0	543.5	20.3	12.1	2.2	27.1
Methionine	6.9	5.4	0.8	18.1	81.4	25.0	42.5	118.4	<LOQ	-	-	-
Phenylalanine	12.9	4.5	5.8	19.8	39.8	20.5	13.5	71.6	<LOQ	-	-	-
Proline	40.4	15.8	17.6	82.5	424.4	108.5	221.7	588.7	12.8	1.3	10.9	13.9
Serine	97.6	28.8	55.4	143.6	204.2	67.5	73.9	291.1	3.2	2.0	0.8	5.4
Taurine	310.6	142.9	168.3	743.0	181.3	25.6	141.9	220.0	7.0	7.4	0.8	16.5
Threonine	81.5	27.7	45.4	132.0	309.3	122.4	99.3	528.4	3.5	2.0	0.8	5.7
Tryptophan	3.4	1.7	0.8	6.2	31.0	13.8	11.0	55.0	1.5	0.5	0.8	1.9
Tyrosine	15.6	11.0	0.8	35.3	67.4	32.8	21.4	119.8	<LOQ	-	-	-
Valine	51.5	17.4	27.1	93.6	98.8	45.6	37.6	166.5	4.7	3.1	0.8	7.8
Total (μM)	3,031.6	775.0	1,997.7	4,569.4	3,460.2	1,028.1	1,557.9	4,868.7	240.5	90.8	169.3	367.1
EAA (μM) ^b	274.6	94.2	177.0	524.0	1 055.6	464.8	300.2	1 826.0	49.0	25.3	11.7	65.1
EAA/Total (%)	9.1	2.2	6.3	12.8	29.2	5.8	19.3	37.5	21.2	13.1	6.5	38.0
NEAA (μM) ^b	2,757.0	715.8	1,767.2	4,192.2	2,404.6	585.7	1,257.6	3,042.7	191.5	82.1	105.0	302.0
NEAA/Total (%)	90.9	2.2	87.2	93.7	70.8	5.8	62.5	80.7	78.8	13.1	62.0	93.5
EAA/NEAA	0.10	0.03	0.07	0.15	0.42	0.11	0.24	0.60	0.30	0.23	0.07	0.61
Glx/Total (%)	60.6	5.5	46.4	69.3	12.2	1.5	10.2	13.9	55.6	15.4	34.8	71.8
SAA (μM) ^c	335.0	143.8	181.9	757.6	295.8	60.5	222.8	378.1	8.5	7.4	2.3	18.0
SAA/Total (%)	11.7	5.9	5.8	27.1	9.0	2.4	7.4	14.7	3.9	4.1	0.9	10.0

^a: Glx: glutamine and glutamic acid^b: EAA: Essential Amino Acids (Sum of His, Arg, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val concentration), NEAA: Non-Essential Amino Acids (Sum of Ala, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys-Cys, Pro, Gly, Ser, Tyr, Cit, Tau concentration) , these EAA were considered as essential for human.^c: SAA: Sulfur Amino Acids : taurine, cysteine and methionine

DISCUSSION

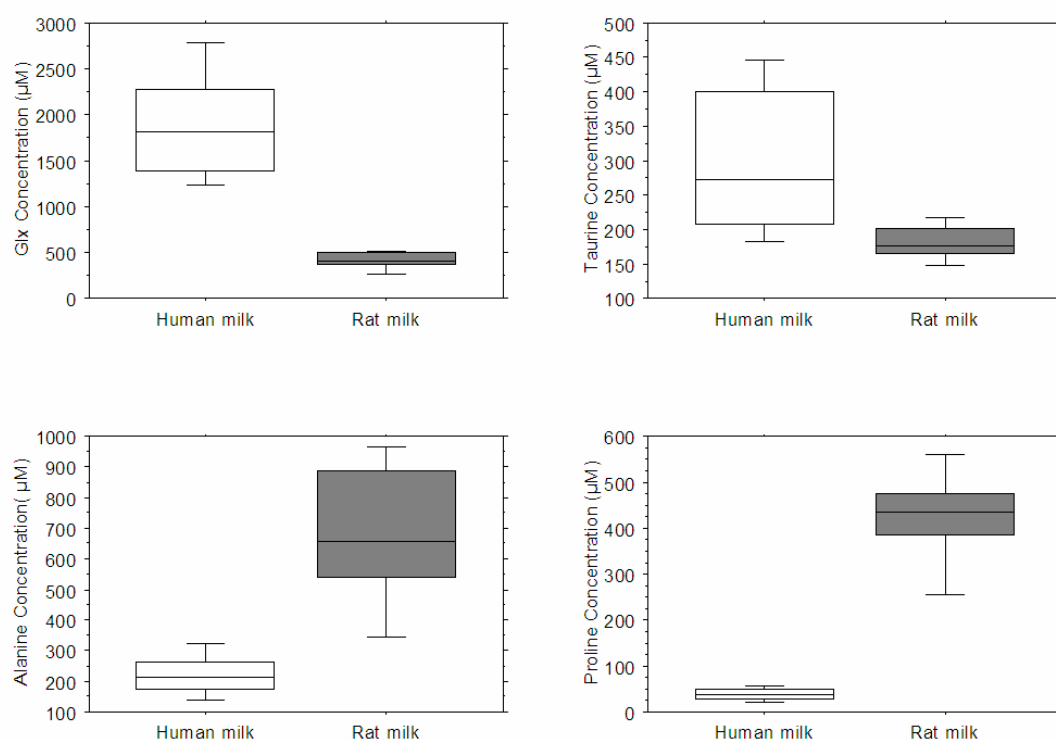
The present work describes the development, optimization, and validation of a micro assay for the quantitation of 21 free amino acids in human and mammalian milk using UPLC-ESI-MS/MS. Whereas FAA have been quantitated in human and cow milk with numerous analytical methods in earlier studies, the current report is first to provide data for rat milk free amino acids. In the current study, to ensure accurate quantitation of amino acids in biological samples, all validation steps were carried out in the milk samples, and the matrix effect was measured by the calculation of recovery for all FAA. The high recoveries (>95%) obtained in milk are similar to those achieved using other methods (Agostoni *et al.* 2000; Carratù *et al.* 2003). In addition, the limits of detection (LOD) in human milk (between 0.2 - 0.9 $\mu\text{mol/L}$) are significantly lower than those (3.3 $\mu\text{mol/L}$) reported by Carratù *et al.* (2003), and Agostoni *et al.* (2000) using HPLC-fluorescence detection. At the lower limit of quantitation (LLOQ), the precision was better than 10% except for cystine.

We observed striking interspecific differences between mature milks of human, ruminant, and rodent regarding both total FAA (from 240 to 3460 μM), the nature of the most abundant FAA, the EAA/NEAA ratio (from 10% to 42%), and the percentage of sulfur amino acids (from 4% to 11.7%).

The human milk samples obtained from our biocollection originated from lactating mothers donating their milk during the first two months of lactation. Taking into account the inter-individual variations, the FAA levels observed are very similar to those obtained in previous studies using a Beckman amino acid analyzer (Atkinson *et al.* 1980; Chuang *et al.* 2005) or HPLC-Fluorescence (Pamblanco *et al.* 1989), and higher than the average 1189 μM reported by Pamblanco *et al.* (Pamblanco *et al.* 1989) using HPLC-UV. The method used in our mammalian milk analysis yields results similar to those obtained with other methods such as reversed-phase HPLC, amino acid analyzer, and ion exchange chromatography amino acid analyzer. Consistent with previous studies (Atkinson *et al.* 1980; Chuang *et al.* 2005; Sarwar *et al.* 1998), we found Glx, taurine and alanine to be the three most abundant FAA, and the EAA/NEAA ratio between 11 and 13% concurs with published values as well (Carratù *et al.* 2003).

Although the composition of many mammalian milks has been analyzed (Sarwar *et al.* 1998), to the best of our knowledge, the current study is first to report the FAA concentrations of rat milk. Whereas Glx was the most abundant amino acid in human and bovine milk, alanine was the most abundant amino acid in rat milk, followed by proline and Glx (Fig 4). The higher EAA/NEAA ratio observed in rat milk (42%) is consistent with the view that rat pups are born more immature than human infants and calves, and therefore are more comparable to human premature neonates with higher nutritional requirements and faster growth rates.

Fig 4: Box and whisker plots showing the distribution of concentrations of main FAA (Glx, Alanine, Taurine and Proline) in human and rat milk.



In cow milk, we found lower total FAA (240 μM) than reported in the few earlier studies analyzing FAA in bovine milk (350 - 460 μM (Jensen 1995) to 1061 μM (Sarwar et al. 1998). In addition, although two studies (Lindmark-Mansson et al. 2003; Sarwar et al. 1998) found Gln, and Tau to be nearly as abundant, we found Glx was by far the most abundant FAA, with much lower levels of other amino acids such as Ala, Gly, Lys, Pro, and Tau in bovine milk. The striking differences observed in free amino acid content and composition between bovine and human milk raise an important issue: does the specific free amino acid composition of human milk provide any health benefit? If so, should infant formulas, which are prepared from bovine milk, be supplemented with specific FAA (besides taurine)? These questions clearly warrant further investigation.

As a matter of fact, although milk FAA can be considered as micronutrients, several amino acids are suspected to have physiological effects in the infant, especially in the first few months after birth. A few animal experiments and clinical trials of FAA supplementation have confirmed these effects. This is particularly the case for glutamine and alanine, the major FAA present in the milk of the three species tested. Glutamine is the most abundant amino acid in the body accounting for about 60% of FAA in human body, and plays many documented roles. For instance, glutamine is a major fuel for the enterocyte, a substrate for purine and pyrimidine nucleotide synthesis, a regulator of protein synthesis (Hankard et al. 1996), and a major donor of carbon for gluconeogenesis (Hankard et al. 1997). Glutamine also supports the function of gut associated intestinal mucosal system (Wu and Knabe 1994), and gut redox state (Humbert et al. 2007), and a role of glutamate has recently been proposed for glutamate in the regulation of food intake (Ventura et al. 2012). Studies performed in human infants have shown that glutamine is extensively taken up

by splanchnic tissues in the first few days of life even in preterm infants with a very low birth weight (Darmaun et al. 1997). Supplementation of infant enteral feeding with glutamine was shown to decrease infectious morbidity but not feeding tolerance in very-low birth weight infants (van den Berg et al. 2005). Alanine, a non essential amino acid in human, is a major substrate involved in gluconeogenesis, and in the citric acid cycle. In a rodent model, alanine was shown to compete for the taurine transport site and to reduce renal cortex taurine content after its ingestion (Chesney 1988). Taurine and lysine, the two other prominent FAA in maternal and bovine milk, respectively, are considered key nutrients for growth and development. Through its role in bile acid conjugation, taurine plays a key role in intestinal fat absorption. Taurine also plays a role in the protection of neurons against oxidative damage (Huxtable 1992; Wharton et al. 2004) although its beneficial effect on long-term neurodevelopmental outcome has still to be proven for preterm infants (Verner et al. 2007). The second most abundant FAA in milk rat, proline, is a glucogenic amino acid, a precursor of the polyamines, which play a key role in gut maturation in human neonates (Plaza-Zamora et al. 2013). In addition, proline is a precursor of arginine (Tomlinson et al. 2011), the sole endogenous precursor of nitric oxide, which plays a critical role in the regulation of intestinal blood flow. Arginine supplementation was suggested to decrease risk of necrotizing enterocolitis in preterm infants (Amin et al. 2002). Wu *et al* (2011) showed the nutritional importance of the arginine–proline cycle for the growth and development of piglet intestine, and supplementation in arginine increased sow' milk production and enhanced the growth of suckling piglets (Mateo et al. 2008).

In conclusion, in this paper, we propose an innovative method to analyze FAA in mammalian milk. The fast sample preparation and short run time, and the low lower limit of detection are definite assets of the method. We are first to report the free amino acid composition of rat milk, and the ability to quantitate free amino acids in microsamples of milk is a definite advantage to assess milk composition in rodents. Regarding human milk, the monitoring of free amino acid composition may be relevant to the nutritional management of human infants. Many free amino acids indeed are thought to exert beneficial effects on infant physiology, but there is a wide range of variation between individuals; so ensuring specific free amino acids are present in a given maternal milk, at concentrations high enough to exert a physiological effect may prove helpful. Moreover, while many studies have shown that maternal diet can alter the fatty acid composition in human milk, very little is known about the potential manipulation of maternal protein and amino acid diet to alter milk amino acid composition, although a study of Guatemalan mothers suggests the source of protein (predominantly from plants vs. animal protein) dietary intake can modulate the free amino acid content of human milk (Wurtman and Fernstrom 1979). Exploring such relationship would clearly be warranted, in view of the increasing interest for research on maternal milk and its health benefits for human infants.

Acknowledgments. This work was funded, in part, by a grant from the Region Pays de la Loire (for the creation of the “Human milk” biocollection at Nantes University Hospital). The salary of Emmanuelle DESNOTS was directly supported by this programme. The authors are grateful to the staff of the Clinical Investigation Centre “Mother and Child” at the University Hospital in Nantes, especially Dr Cécile BOSCHER (MD) and Arnaud LEGRAND for their invaluable help in the management of the biocollection, to Hélène BILLARD for the preparation of the human milk samples from the biocollection, and also to Evelyne BERNARDIN for editing the bibliography.

References

- Agostoni C, Carratu B, Boniglia C, Lammardo AM, Riva E, Sanzini E (2000) Free glutamine and glutamic acid increase in human milk through a three-month lactation period. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31 (5):508-512
- Amin HJ, Zamora SA, McMillan DD, Fick GH, Butzner JD, Parsons HG, Scott RB (2002) Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. *J Pediatr* 140 (4):425-431. doi:S0022-3476(02)06379-5
- Armenta JM, Cortes DF, Pisciotto JM, Shuman JL, Blakeslee K, Rasoloson D, Ogunbiyi O, Sullivan DJ, Jr., Shulaev V (2010) Sensitive and rapid method for amino acid quantitation in malaria biological samples using AccQ.Tag ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS with multiple reaction monitoring. *Anal Chem* 82 (2):548-558. doi:10.1021/ac901790q
- Arnould JPY, Boyd IL (1995) Inter- and intra-annual variation in milk composition in Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*). *Physiol Zool* 68 (6):1164-1180
- Atkinson SA, Anderson GH, Bryan MH (1980) Human milk: comparison of the nitrogen composition in milk from mothers of premature and full-term infants. *Am J Clin Nutr* 33 (4):811-815
- Carratù B, Boniglia C, Scalise F, Ambruzzi AM, Sanzini E (2003) Nitrogenous components of human milk : non-protein nitrogen, true protein and free amino acids. *Food Chem* 81 (3):357-362
- Chesney RW (1988) Taurine: is it required for infant nutrition? *J Nutr* 118 (1):6-10
- Chuang CK, Lin SP, Lee HC, Wang TJ, Shih YS, Huang FY, Yeung CY (2005) Free amino acids in full-term and pre-term human milk and infant formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40 (4):496-500. doi:00005176-200504000-00018 [pii]
- Darmaun D, Roig JC, Auestad N, Sager BK, Neu J (1997) Glutamine metabolism in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 41 (3):391-396. doi:10.1203/00006450-199703000-00015
- Dietzen DJ, Weindel AL, Carayannopoulos MO, Landt M, Normansell ET, Reimsschisel TE, Smith CH (2008) Rapide comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post column ninhydrin detection. *Rapid Commun in mass Spectrom* 22: 3481-3488

- Grigor MR, Allan J, Carne A, Carrington JM, Geursen A (1986) Milk composition of rats feeding restricted litters. *Biochem J* 233 (3):917-919
- Hankard RG, Haymond MW, Darmaun D (1996) Effect of glutamine on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 271 (4 Pt 1):E748-754
- Hankard RG, Haymond MW, Darmaun D (1997) Role of glutamine as a glucose precursor in fasting humans. *Diabetes* 46 (10):1535-1541
- Horta BL, Bahl R, Martines JC, Victora CG (2007) Evidence on the long-term effects of breastfeeding. Systematic reviews and meta-analyses. World Health Organization. Geneva (CH)
- Humbert B, Nguyen P, Martin L, Dumon H, Vallette G, Maugere P, Darmaun D (2007) Effect of glutamine on glutathione kinetics in vivo in dogs. *J Nutr Biochem* 18 (1):10-16. doi:S0955-2863(06)00044-1
- Huxtable RJ (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72 (1):101-163
- Imaki H, Jacobson SG, Kemp CM, Knighton RW, Neuringer M, Sturman J (1993) Retinal morphology and visual pigment levels in 6- and 12-month-old rhesus monkeys fed a taurine-free human infant formula. *J Neurosci Res* 36 (3):290-304. doi:10.1002/jnr.490360307
- Jensen RG (1995) Handbook of milk composition. Academic Press, Inc edn.
- Jochum F, Colling S, Meinardus P, Alteheld B, Stehle P, Fusch C (2006) Total glutamine content in human milk is not influenced by gestational age. *Acta Paediatrica* 95: 985-990
- Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner PJ (2008) Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. *J Chrom B* 870(2):222-232
- Lin CC and Liu CY (2004) Proline-coated column for the capillary electrochromatographic separation of amino acids by in-column derivatization. *Electrophoresis* 25: 3216-3223
- Lindmark-Mansson H, Fondén R, Pettersson H-E (2003) Composition of Swedish dairy milk. *Int Dairy J* 13:409-425
- Mateo RD, Wu G, Moon HK, Carroll JA, Kim SW (2008) Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. *J Anim Sci* 86 (4):827-835. doi:jas.2007-0371
- Namera A, Yashiki M, Nishida M, Kojima T (2002) Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *J chrom B* 776:49-55

- Pamblanco M, Portoles M, Paredes C, Ten A, Comin J (1989) Free amino acids in preterm and term milk from mothers delivering appropriate- or small-for-gestational-age infants. *Am J Clin Nutr* 50 (4):778-781
- Plaza-Zamora J, Sabater-Molina M, Rodriguez-Palmero M, Rivero M, Bosch V, Nadal JM, Zamora S, Larque E (2013) Polyamines in human breast milk for preterm and term infants. *Br J Nutr*: [Epub ahead of print] 1-5. doi:S0007114512005284
- Riek A (2008) Relationship between milk energy intake and growth rate in suckling mammalian young at peak lactation : an updated meta-analysis. *J Zool* 274 (2):160-170
- Salazar C, Armenta JM, Cortes DF, Shulaev V (2012) Combination of an AccQ.Tag-ultra performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids. *Methods Mol Biol* 828:13-28. doi:10.1007/978-1-61779-445-2_2
- Sarwar G, Botting HG, Davis TA, Darling P, Pencharz PB (1998) Free amino acids in milks of human subjects, other primates and non-primates. *Br J Nutr* 79 (2):129-131. doi:S0007114598000245
- Schanler RJ, Garza C (1987) Plasma amino acid differences in very low birth weight infants fed either human milk or whey-dominant cow milk formula. *Pediatr Res* 21 (3):301-305. doi:10.1203/00006450-198703000-00021
- Tomlinson C, Rafii M, Sgro M, Ball RO, Pencharz P (2011) Arginine is synthesized from proline, not glutamate, in enterally fed human preterm neonates. *Pediatr Res* 69 (1):46-50. doi:10.1203/PDR.0b013e3181fc6ab7
- van den Berg A, van Elburg RM, Westerbeek EA, Twisk JW, Fetter WP (2005) Glutamine-enriched enteral nutrition in very-low-birth-weight infants and effects on feeding tolerance and infectious morbidity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 81 (6):1397-1404. doi:81/6/1397 [pii]
- Ventura AK, Beauchamp GK, Mennella JA (2012) Infant regulation of intake: the effect of free glutamate content in infant formulas. *Am J Clin Nutr* 95 (4):875-881. doi:ajcn.111.024919
- Verner A, Craig S, McGuire W (2007) Effect of taurine supplementation on growth and development in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD006072. doi:10.1002/14651858.CD006072.pub2
- Wharton BA, Morley R, Isaacs EB, Cole TJ, Lucas A (2004) Low plasma taurine and later neurodevelopment. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89 (6):F497-498. doi:89/6/F497

- Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, Li P, Li X, McKnight JR, Satterfield MC, Spencer TE (2011) Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids* 40 (4):1053-1063. doi:10.1007/s00726-010-0715-z
- Wu G, Knabe DA (1994) Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. *J Nutr* 124 (3):415-424
- Wurtman JJ, Fernstrom JD (1979) Free amino acid, protein, and fat contents of breast milk from Guatemalan mothers consuming a corn-based diet. *Early Hum Dev* 3 (1):67-77
- Yamawaki N, Yamada M, Kan-no T, Kojima T, Kaneko T, Yonekubo A (2005) Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J Trace Elem Med Biol* 19 (2-3):171-181. doi:S0946-672X(05)00100-8

Étude du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique chez le rat dans un modèle de programmation métabolique

Selon le concept de « programmation métabolique », un environnement nutritionnel périnatal délétère, et plus particulièrement une modification de la trajectoire de croissance prénatale, prédisposerait au développement de l'obésité et du diabète de type 2 à l'âge adulte. Dans ce contexte et au cours de ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que la nutrition périnatale modifierait durablement chez la descendance le comportement alimentaire et le métabolisme énergétique favorisant l'apparition de ces dérégulations métaboliques. Cette étude a été réalisée sur un modèle rongeur de programmation métabolique induit par restriction protéique maternelle en période périnatale, dont la descendance adulte a été exposée à un régime de type Occidental, où approches méthodologiques ciblées (comportementales, fonctionnelles et biologiques) et non ciblées (phénotypage métabolomique) ont été intégrées. Nos résultats montrent qu'une croissance *in utero* lente modifie durablement le rythme de la prise alimentaire, prédispose à l'accrétion adipeuse et altère la fonction mitochondriale. Chez la descendance dont uniquement la croissance postnatale a été ralentie, malgré une altération des signaux satiétogènes, la composition corporelle se maintient et l'insulino-sensibilité augmente. D'autre part, la restriction protéique maternelle induit une modification de la composition du lait, ce qui pourrait expliquer les modifications précoces du métabolisme énergétique et sa reprogrammation sur le long terme. Ces nouvelles données incitent à poursuivre les recherches expérimentales et cliniques pour mieux comprendre les mécanismes conduisant au développement des maladies métaboliques.

Mots clefs: nutrition périnatale, trajectoire de croissance, programmation métabolique, restriction protéique maternelle, comportement alimentaire, métabolisme énergétique, insulino-sensibilité, composition du lait

Feeding behaviour and energy metabolism study in a model of metabolic programming in rats

According to the concept of “metabolic programming”, an adverse perinatal nutritional environment and particularly a modification of the prenatal growth trajectory, could predispose to the development of obesity and type 2 diabetes later in life. In this context, the present study has investigated in what extend perinatal nutrition permanently alter feeding behaviour and energy metabolism what could contribute to the onset of metabolic disorders in adulthood. This work was experimentally conducted on a rodent model of metabolic programming induced by maternal protein restriction in the perinatal period with the subsequent exposure of the adult offspring to a Western diet, where both targeted methodological approaches (behavioural, functional and biological) and untargeted metabolomic phenotyping were integrated. Our results show that a slow growth *in utero* permanently alters feeding rhythms, predisposes to fat accretion and alters mitochondrial function. In the offspring where only postnatal growth was slowed, despite an impaired satiety-control, the body composition is maintained and insulin sensitivity increases. Additionally, maternal protein restriction induces a change in the composition of milk, which could explain the early changes in energy metabolism and long-term reprogramming. These new data encourage further experimental and clinical research in order to improve our understanding in mechanisms involved in the development of metabolic diseases.

Key words: perinatal nutrition, growth trajectory, metabolic programming, maternal protein restriction, feeding behaviour, energy metabolism, insulin sensitivity, milk composition