

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Hypoxie placentaire et atteinte surrénalienne fœtale dans un modèle de restriction de croissance intra-utérine chez le rat

par
Karine Bibeau

Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctorae ès Sciences (Ph.D.)
en sciences biomédicales

Janvier 2008

© Karine Bibeau, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Hypoxie placentaire et atteinte surrénalienne fœtale dans
un modèle de restriction de croissance intra-utérine chez le
rat**

présentée par :
Karine Bibeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André Lacroix
Président-rapporteur

Dre Michèle Brochu
Directrice de recherche

Dr Jacques Lussier
Membre du jury

Dr Yves Tremblay
Examineur externe

SOMMAIRE ET MOTS-CLÉS EN FRANÇAIS

Un modèle animal de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) a été développé en donnant une diète faible en sodium à des rates au cours du dernier tiers de gestation (jours 15 à 22). Ce traitement empêche l'expansion volémique maternelle et l'augmentation du diamètre des artères utérines associées à la gestation normale, indiquant une réduction de la perfusion utéro-placentaire à l'origine de la diminution du poids des placentas et de la redistribution du flot sanguin observée chez les fœtus RCIU. Chez les animaux RCIU adultes, diverses atteintes systémiques menant au développement de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires ont été révélées (pression artérielle augmentée, dysfonction rénale, altérations du système rénine-angiotensine-aldostérone, remodelage cardiaque hypertrophique, réponse altérée au sel). Chez le rat, l'invasion trophoblastique permettant la mise en place d'une circulation utéro-placentaire fonctionnelle s'amorce au 13^e jour de gestation. De plus, le développement de la surrénale débute au même moment et se poursuit jusqu'au terme de la gestation. Considérant l'ensemble de ces éléments, nous avons formulé l'hypothèse que la RCIU observée dans notre modèle serait associée à une hypoxie placentaire entraînant une programmation fonctionnelle de la surrénale fœtale par des modifications de la stéroïdogénèse et de la synthèse des catécholamines. Dans les placentas RCIU, une augmentation du taux d'apoptose a été observée, pouvant expliquer la diminution de leur poids. L'augmentation de l'expression du VEGF, particulièrement dans la zone labyrinthe où se produisent les échanges fœto-maternels, et du VEGFR1 laisse supposer que l'assemblage de vaisseaux sanguins est favorisé de manière à compenser la diminution de perfusion utéro-placentaire. L'augmentation protéique de eNOS présume une dilatation vasculaire. Cependant, cette compensation ne suffit pas à subvenir aux besoins en oxygène des fœtus RCIU puisque l'analyse d'expression génique par microréseau produite à partir de surrénales fœtales de femelles révèle une hypoxie chez ces animaux. De ce fait, la surrénale fœtale présente de nombreuses altérations au niveau de l'expression de gènes participant, entre autres, à la stéroïdogénèse et à la synthèse des catécholamines. Il est possible que ces changements soient à l'origine de réponses adaptatives du fœtus en regard de son environnement, entraînant des modifications permanentes et néfastes de son organisme et de ses systèmes biologiques qui se manifesteront lors de la vie adulte par le développement de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires tel qu'observés chez les animaux RCIU de 12 semaines.

Mots-clés : programmation fœtale, restriction de croissance intra-utérine, placenta, surrénale, hypoxie, apoptose, stéroïdogénèse, catécholamines

SOMMAIRE ET MOTS-CLÉS EN ANGLAIS

An animal model of intrauterine growth restriction (IUGR) has been developed by giving a low sodium diet to rats over the last third of gestation (days 15 to 22). This treatment prevents maternal circulating volume expansion and the increase in uterine arteries diameter associated with normal gestation, indicating a reduction in uteroplacental perfusion that led to a decrease in placental weight and a blood flow redistribution in IUGR fetuses. In adult IUGR animals, various systemic alterations leading to the development of risk factors for cardiovascular diseases have been revealed (increased blood pressure, renal dysfunction, renin-angiotensin-aldosterone system alterations, cardiac hypertrophic remodeling, altered response to salt). In rats, trophoblast invasion enabling the establishment of a functional uteroplacental circulation begins at 13th day of gestation. In addition, adrenal development is initiated at the same time and continues until term. Considering all these factors, we have hypothesized that IUGR observed in our model is associated with placental hypoxia leading to functional programming of the fetal adrenal through alterations of steroidogenesis and catecholamine synthesis. In IUGR placentas, we observed an increased rate of apoptosis that may explain the decreased placental weight. The increased expression of VEGF, especially in the labyrinth where fetomaternal exchanges occur, and of VEGFR1 suggests that blood vessels assembly is enhanced in order to compensate the decreased uteroplacental perfusion. The increase eNOS protein level presumed vascular dilatation. However, this compensation is not enough to support oxygen supply to IUGR fetuses because gene expression by microarray performed on female fetal adrenals reveals hypoxia in these animals. As a result, the fetal adrenal presents many alterations in the expression of genes involved in steroidogenesis and catecholamine synthesis. It is possible that these changes are at the origin of adaptive responses of the fetus next to its environment, causing permanent and damaging changes to its organism and biological systems that will become apparent during adult life through the development of risk factors for cardiovascular diseases as seen in 12-week-old IUGR animals.

Key words: fetal programming, intra-uterine growth restriction, placenta, adrenal, hypoxia, apoptosis, steroidogenesis, catecholamines

TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE PRÉSENTATION DE LA THÈSE	i
PAGE DE PRÉSENTATION DU JURY	ii
SOMMAIRE ET MOTS-CLÉS EN FRANÇAIS	iii
SOMMAIRE ET MOTS-CLÉS EN ANGLAIS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
<hr/>	
1 LA GROSSESSE	3
1.1 LA PHYSIOLOGIE MATERNELLE AU COURS DE LA GROSSESSE	3
1.1.1 Chez la femme	3
1.1.2 La rate comme modèle animal de la grossesse	5
1.2 LE DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA	6
1.2.1 La chronologie du développement placentaire	6
1.2.1.1 <i>Chez la femme</i>	7
1.2.1.2 <i>Chez la rate</i>	11
1.2.2 Un survol des éléments impliqués dans le développement du placenta	13
1.2.2.1 <i>La vasculogénèse et l'angiogénèse</i>	15
> <i>Les facteurs de croissance vasculaire endothéliale</i>	16
> <i>Leur implication dans le développement du placenta</i>	17
1.2.2.2 <i>L'apoptose</i>	18
> <i>La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque)</i>	19
> <i>La voie mitochondriale (voie intrinsèque)</i>	19
> <i>Son implication dans le développement du placenta</i>	20
1.2.2.3 <i>Le monoxyde d'azote</i>	21
> <i>La synthèse du monoxyde d'azote</i>	21
> <i>Son implication dans la circulation placentaire et l'invasion trophoblastique</i>	21
1.2.2.4 <i>Le stress oxydatif et nitrosatif</i>	22
> <i>Les espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote et leurs dégâts cellulaires</i>	22
> <i>Les systèmes antioxydants</i>	23
> <i>Le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans le développement placentaire</i>	23
1.2.3 Les échanges fœto-maternels : le transport du glucose	24
1.2.4 Les fonctions endocrines du placenta	26
> <i>Les hormones stéroïdiennes</i>	26
> <i>Les hormones peptidiques</i>	28
1.3 L'ENVIRONNEMENT INTRA-UTÉRIN ET SES RÉPERCUSSIONS	29
1.3.1 La restriction de croissance intra-utérine	29

1.3.1.1	<i>La définition</i>	29
1.3.1.2	<i>Les étiologies</i>	30
1.3.1.3	<i>Les conséquences à court et long terme</i>	30
1.3.2	L'origine développementale des maladies de l'adulte	31
1.3.2.1	<i>Un aperçu des modèles animaux</i>	32
1.3.2.2	<i>Notre modèle : la restriction sodique</i>	34
1.3.2.3	<i>Les mécanismes sous-jacents de la plasticité développementale</i>	37
	> <i>Gènes</i>	37
	> <i>Cellules</i>	38
	> <i>Tissus et organes</i>	38
	> <i>Systèmes</i>	39
2	<u>LA SURRÉNALE</u>	39
2.1	LES ZONES FONCTIONNELLES DE LA SURRÉNALE ADULTE	40
2.2	LES FONCTIONS ENDOCRINES DE LA SURRÉNALE	41
2.2.1	La stéroïdogénèse surrénalienne	41
2.2.2	Les fonctions des hormones de la corticosurrénaie	46
	2.2.2.1 <i>Les minéralocorticoïdes</i>	46
	2.2.2.2 <i>Les glucocorticoïdes</i>	48
2.2.3	La synthèse des catécholamines	49
2.2.4	Les fonctions des hormones de la médullosurrénaie	49
2.3	LA RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION HORMONALE	50
2.3.1	Le cortex surrénalien	51
	2.3.1.1 <i>La zona glomerulosa : l'angiotensine II, le potassium et la corticotrophine</i>	51
	> <i>Le système rénine-angiotensine</i>	51
	> <i>Le potassium</i>	52
	> <i>La corticotrophine</i>	53
	2.3.1.2 <i>Les zona fasciculata et reticularis : la corticotrophine et la vasopressine</i>	53
2.3.2	La médulla surrénalienne	54
2.4	LE DÉVELOPPEMENT DE LA SURRÉNALE	55
2.4.1	Chez l'humain	55
	2.4.1.1 <i>La corticosurrénaie</i>	55
	2.4.1.2 <i>L'ontogénie des enzymes de la stéroïdogénèse</i>	58
	2.4.1.3 <i>La médullosurrénaie</i>	59
	2.4.1.4 <i>L'ontogénie des enzymes catécholaminergiques</i>	59
2.4.2	Chez le rat	60
3	<u>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL</u>	61
	CHAPITRE 2. MANUSCRIT 1	63
	PLACENTAL HYPOXIA IN INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION INDUCED BY A LOW-SODIUM DIET	

CHAPITRE 3. MANUSCRIT 2	95
REDUCED FETAL GLUCOCORTICIDS IN A RAT MODEL OF FETAL PROGRAMMING OF ADULT DISEASES	
CHAPITRE 4. MANUSCRIT 3	117
ALTERED ADRENAL FUNCTIONS IN A RAT MODEL OF FETAL PROGRAMMING OF ADULT DISEASES	
CHAPITRE 5. DISCUSSION ET CONCLUSION	145
BIBLIOGRAPHIE	153
ANNEXE I : ACCORD DES COAUTEURS	169

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Comparaison de la grossesse chez la femme et de la gestation chez la rate.
- Figure 2.** L'adhésion et l'implantation du blastocyste.
- Figure 3.** Schéma simplifié des stades de développement des villosités placentaires chez l'humain.
- Figure 4.** L'invasion endovasculaire.
- Figure 5.** Le développement du placenta chez le rat.
- Figure 6.** Comparaison du placenta chez l'humain et le rat.
- Figure 7.** Diagramme illustrant les voies de signalisation induites par la liaison du VEGF et du PlGF à leurs récepteurs.
- Figure 8.** Voies extrinsèque et intrinsèque d'induction de l'apoptose.
- Figure 9.** Les voies du transport du glucose dans le placenta humain et de rat.
- Figure 10.** Comparaison des fonctions endocrines du placenta humain et de rat.
- Figure 11.** Les principales sources de cholestérol et les enzymes-clés responsables de son métabolisme dans la stéroïdogénèse surrénalienne.
- Figure 12.** La stéroïdogénèse surrénalienne chez l'humain.
- Figure 13.** La biosynthèse des catécholamines.
- Figure 14.** Les modèles expliquant la formation des zones corticales de la surrénale.
- Figure 15.** Hypoxie placentaire et programmation de la surrénale dans un modèle de rat de RCIU induite par une diète maternelle faible en sodium.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les zones fonctionnelles de la corticosurrénale mature chez l'humain.

Tableau 2. Les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse surrénalienne chez l'humain.

 LISTE DES ABRÉVIATIONS

 - A -

ACAT	: Acyl-CoA cholestérol acyl transférase
ACE	: Enzyme de conversion de l'angiotensine (<i>angiotensin converting enzyme</i>)
ACTH	: Corticotrophine (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AGT	: Angiotensinogène
AI	: Angiotensine I
AII	: Angiotensine II
aMLC-1	: Chaîne légère de la myosine de l'atrium (<i>atrial myosin light chain 1</i>)
AMPC	: Adénosine monophosphate cyclique
ANP	: Peptide natriurétique de l'oreillette (<i>atrial natriuretic peptide</i>)
Apaf-1	: Facteur activant les protéases apoptotiques (<i>apoptosis protease-activating factor 1</i>)
AT	: Récepteur de l'AII (<i>angiotensin II receptor</i>)

 - C -

C	: Carbone
CaM	: Calmoduline
CCaMK	: Protéine kinase calcium/CaM-dépendante (<i>calcium/calmodulin-dependant protein kinase</i>)
CRH	: Corticolibérine (<i>corticotrophin releasing hormone</i>)
CRHR1	: Récepteur de la CRH de type 1 (<i>type 1 corticotrophin releasing hormone receptor</i>)
CYP	: Cytochrome P450
CYP11A	: <i>Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage</i>
CYP11B1	: CYP 11 β -hydroxylase
CYP11B2	: CYP aldostérone synthase
CYP17	: CYP 17 α -hydroxylase/17,20 lyase
CYP21	: CYP 21-hydroxylase

 - D -

D β H	: Dopamine β hydroxylase
DAG	: Diacylglycérol
DHEA	: Déhydroépiandrostérone
DISC	: Complexe de signalisation induisant la mort (<i>death-inducing signalling complex</i>)
DMR	: Région différenciellement méthylée (<i>differentially methylated region</i>)
DOPA	: Dihydroxyphénylalanine

 - E -

ENaC	: Canal sodique épithélial (<i>epithelial sodium channel</i>)
eNOS	: NOS endothéliale (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)

 - F -

FSH	: Hormone folliculostimulante (<i>follicle-stimulating hormone</i>)
-----	---

 - G -

G	: Jour de gestation
GH	: Hormone de croissance (<i>growth hormone</i>)
GLUT	: Transporteur de glucose (<i>glucose transporter</i>)
GPCR	: Récepteur couplé aux protéines G (<i>G protein-coupled receptor</i>)
GR	: Récepteur des glucocorticoïdes (<i>glucocorticoid receptor</i>)
GTP	: Guanosine triphosphate

- H -

H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
hCG	: Gonadotrophine chorionique humaine (<i>human chorionic gonadotrophin</i>)
HDL	: Lipoprotéine de haute densité (<i>high-density lipoprotein</i>)
HIF	: Facteur inducible par l'hypoxie (<i>hypoxia-inducible factor</i>)
HMG-CoA	: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
hPL	: Hormone lactogène placentaire humaine (<i>human placental lactogen</i>)
HRE	: Élément de réponse à l'hypoxie (<i>hypoxia response element</i>)
HSD	: Hydroxystéroïde déshydrogénase
3βHSDII	: 3βHSD/isomérase de type II
11βHSD2	: 11βHSD de type 2
HSL	: Lipase hormono-sensible (<i>hormone sensitive-lipase</i>)
hsp	: Protéine thermolabile (<i>heat shock protein</i>)

- I -

IGF	: Facteur de croissance similaire à l'insuline (<i>insulin-like growth factor</i>)
iNOS	: NOS inducible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IP₃	: Inositol 1,4,5-triphosphate

- L -

LDL	: Lipoprotéine de faible densité (<i>low-density lipoprotein</i>)
LH	: Hormone lutéinisante (<i>luteinizing hormone</i>)

- M -

MAPK	: Protéine kinase activée par un mitogène (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MC2R	: Récepteur de la mélanotrophine de type 2 (<i>melanocortin 2 receptor</i>)
mitoTSPO	: Protéine de translocation mitochondriale (<i>mitochondrial translocator protein</i>)
MR	: Récepteur des minéralocorticoïdes (<i>mineralocorticoid receptor</i>)

- N -

NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nCEH	: Cholestérol ester hydrolase neutre (<i>neutral cholesterol ester hydrolase</i>)
NIH	: Instituts Nationaux de la Santé (<i>National Institutes of Health</i>)
nNOS	: NOS neuronale (<i>neuronal nitric oxide synthase</i>)
NO[•]	: Monoxyde d'azote (<i>nitric oxide</i>)
NOS	: Synthase du monoxyde d'azote (<i>nitric oxide synthase</i>)

- O -

O₂^{•-}	: Anion superoxyde
OH[•]	: Radical hydroxyl
ONOO⁻	: Peroxynitrite

- P -

PBR	: <i>Peripheral-type benzodiazepine receptor</i>
PKA	: Protéine kinase A
PKC	: Protéine kinase C
PLC	: Phospholipase C
PIGF	: Facteur de croissance placentaire (<i>placental growth factor</i>)
PNMT	: Phényléthanolamine-N-méthyltransférase
POMC	: Pro-opiomélanocortine

PVN : Noyau paraventriculaire (*paraventricular nucleus*)

- R -

RCIU : Restriction de croissance intra-utérine
RNS : Espèces réactives dérivées de l'azote (*reactive nitrogen species*)
ROMK : Canal potassique de la médulla externe du rein (*renal outer medullary potassium channel*)
ROS : Espèces réactives dérivées de l'oxygène (*reactive oxygen species*)
rPL : Hormone lactogène placentaire de rat (*rat placental lactogen*)

- S -

SGK1 : Protéine kinase 1 induite par le sérum et par les glucocorticoïdes (*serum- and glucocorticoid-induced kinase 1*)
SOD : Superoxyde dismutase
SRA : Système rénine-angiotensine
SR-BI : Récepteur d'épuration classe B type I (*scavenger receptor class B type I*)
StAR : *Steroidogenic acute regulatory protein*
START : *Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer*
sVEGFR1 : Récepteur soluble de type 1 du VEGF

- T -

TASK : *Tandem of P domains in a weak inwardly rectifying potassium channel (TWIK)-related acid-sensitive potassium channel*
TH : Tyrosine-hydroxylase
TNF : Facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*)
TRAIL : Ligand apparenté au TNF induisant l'apoptose (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*)
TSH : Thyrotrophine (*thyroid-stimulating hormone*)

- V -

VEGF : Facteur de croissance vasculaire endothéliale (*vascular endothelial growth factor*)
VEGFR : Récepteur du VEGF (*vascular endothelial growth factor receptor*)
VP : Vasopressine

- Z -

ZF : Zona fasciculata
ZG : Zona glomerulosa
ZR : Zona reticularis

REMERCIEMENTS

Les remerciements... Peut-être l'une des parties les plus difficiles à réaliser dans une thèse puisque c'est la seule où l'on doit faire preuve de réelle inspiration et de talents littéraires, de créativité et surtout, de cœur, où les articles et les ouvrages de référence ne sont plus d'aucune utilité! Je ferai donc de mon mieux ☺

Tout d'abord, il me serait impossible de commencer ces remerciements sans évoquer la personne qui m'a proposé un sujet assez passionnant pour m'entraîner dans trois belles autres années d'études graduées et qui a su m'encadrer avec sagesse et justesse aux moments les plus opportuns : le Dre Michèle Brochu. Grâce à nos discussions, non seulement m'a-t-elle permis d'aiguiser mon esprit critique et ma rigueur scientifique, mais elle m'a appris à demeurer positive face aux multiples surprises que nous réserve le monde de la recherche. Je salue également sa souplesse et son ouverture d'esprit qui m'ont laissé la liberté d'orienter ce travail de recherche selon mes aspirations. Aussi, je ne pourrais oublier de souligner ses innombrables, mais combien inestimables conseils, qui me permettront assurément d'éviter certaines des embûches qui parsèmeront le futur chemin de ma carrière en recherche. Et passé outre à tout ce monde scientifique, je lui suis aussi reconnaissante de m'avoir aidée à devenir, je crois, une meilleure personne...

Je me dois également de souligner le Dr Jean St-Louis qui a été une précieuse source de sagesse et de conseils. Ses nombreuses connaissances et ses encouragements ont toujours su me remettre sur le droit chemin.

Je remercie tous les membres de mon jury, c'est-à-dire les Drs André Lacroix, Jacques Lussier et Yves Tremblay, d'avoir accepté de contribuer à l'amélioration de ce travail. En dépit des délais et des contraintes imposés, ils ont su me démontrer leur appui.

Pour leur soutien technique et la qualité de leur collaboration, je tiens à remercier le Dre Nicole Gallo-Payet et son étudiante au doctorat, Mélissa Otis, ainsi que le Dr Martin Sirois et sa technicienne de recherche, Dominique Lauzier. Les expériences réalisées dans leur laboratoire ont indéniablement participé à la qualité des travaux effectués au cours de mes années d'études doctorales.

J'exprime toute ma reconnaissance à mes collègues de travail de tous les jours, Marie-Claude, Annie, Pierre-André, Benoit, Cindy, Mélanie, Rébecca, Marie-Ève, Véronique, Gabrielle, Mathieu, Pascale, Mylène et Leslie pour tous les moments de bonheur et de complicité vécus au cours des dernières années. Sans eux, mes conditions de travail auraient sans aucun doute été très différentes et nettement moins agréables. Ils ont tous su, à un moment ou un autre, être une oreille attentive, une aide précieuse et surtout, une occasion de détente me donnant le sourire, le plaisir de poursuivre et d'aller de l'avant!

Enfin, je remercie chaleureusement ma famille et mes amis pour le soutien et les encouragements fournis tout au long de mon parcours académique. Je me dois surtout de témoigner ma gratitude envers ma charmante grand-maman Louise et ma tante Brigitte qui ont toutes deux accepté de passer en revue ce document à la recherche des fautes et des coquilles que j'y aurais laissées. Et pour terminer, je dois un merci tout particulier à Bruno, mon amoureux, pour l'incroyable patience dont il fait preuve à mon égard, pour ses multiples et judicieuses recommandations ainsi que pour l'attention et l'écoute accordées à mes nombreux questionnements. Toujours présent pour m'apporter soutien et réconfort, mais aussi rigolades et détente, je lui suis infiniment reconnaissante de me laisser poursuivre mes rêves et mes aspirations... et de m'avoir fait le plus beau des cadeaux, notre petite Laurence 😊.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin.

– Erwin Chargaff, biochimiste américain –

Un régime alimentaire inadéquat, un mode de vie sédentaire, un environnement néfaste (consommation d'alcool et de tabac, pollution) et un bagage génétique associé à une histoire familiale sont des facteurs de risque reconnus des maladies associées au vieillissement (diabète de type 2, maladies cardiovasculaires et autres). Toutefois, la publication d'études portant sur la relation entre le faible poids de naissance à terme, ou la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), et l'incidence de ces maladies a également mis en lumière l'importance de la qualité de l'environnement intra-utérin. Élaboré par le professeur David Barker au début des années 1990, ce concept connu sous le nom d'origine fœtale des maladies de l'adulte propose que la malnutrition pendant la période fœtale entraîne des altérations permanentes au sein de l'organisme en développement, ces changements devenant délétères et conduisant à la maladie lorsque l'environnement postnatal diffère de l'environnement intra-utérin. Des travaux ultérieurs ayant démontré que la nutrition et la croissance au cours de la période néonatale et l'enfance influencent le risque de développement de ces maladies, on parle désormais de l'origine développementale des maladies de l'adulte.

Le fait que la RCIU soit reconnue comme un facteur de risque des maladies chroniques de l'âge adulte soulève la nécessité d'améliorer les conditions physiologiques qui supportent le développement et la croissance du fœtus. De nos jours, l'incidence de RCIU est estimée à 5% au sein de la population obstétricale générale, représentant plus de 4000 enfants au Québec. La RCIU n'étant pas une maladie en elle-même, mais plutôt la manifestation de certains désordres émanant de la mère comme du fœtus, sa pathophysiologie est complexe. Ainsi, sa compréhension repose en partie sur la recherche fondamentale à l'aide, entre autres, de modèles animaux. Jusqu'à récemment, l'intérêt principal des études était de définir les conséquences phénotypiques (cardiovasculaires, métaboliques, endocriniennes et comportementales) d'un environnement intra-utérin défavorable. À ce titre, nous nous sommes attardés à la caractérisation de la surrénale fœtale dans un modèle animal de RCIU élaboré par notre laboratoire. Les résultats découlant de ces expériences nous ont permis de préparer deux manuscrits, dont un a été soumis récemment. Dans la littérature, l'accent est maintenant mis sur la détermination des mécanismes par lesquels l'environnement fœtal entraîne ces dysfonctions. Ce champ d'intérêt a pris beaucoup d'ampleur, incluant même des études concernant l'environnement nutritionnel de l'embryon afin de cerner les effets de la manipulation des gamètes et des embryons

dans le cadre des techniques de reproduction assistée sur la santé à long terme. Dans ce contexte, nous avons entrepris des travaux, qui font l'objet d'un article en préparation, nous permettant d'examiner l'implication potentielle de l'hypoxie placentaire dans la RCIU observée dans notre modèle animal.

1. LA GROSSESSE

La grossesse est un état physiologique particulier qui entraîne plusieurs modifications de l'homéostasie maternelle. L'adaptation de l'organisme maternel à cette condition est primordiale afin d'assurer le développement et la croissance du fœtus par un apport approprié en oxygène et en nutriments. À ce titre, le placenta, de par sa responsabilité dans les échanges entre la mère et son fœtus, joue un rôle essentiel au bon déroulement de la grossesse. Il arrive toutefois que la grossesse soit compliquée par certaines situations telles que l'hypertension (prééclampsie) ou la RCIU qui sont d'importantes causes de morbidité et de mortalité périnatales. Cette dernière condition est de plus associée à un risque accru de développement perturbé ou de maladies liées à l'âge adulte (maladies coronariennes, hypertension, diabète de type 2, syndrome métabolique, athérosclérose et autres).

1.1 LA PHYSIOLOGIE MATERNELLE AU COURS DE LA GROSSESSE

Des adaptations maternelles majeures sur les plans anatomique, physiologique, métabolique et biochimique sont requises au maintien du développement et de la croissance du fœtus. Ces modifications affectent profondément pratiquement tous les systèmes et organes maternels et s'amorcent peu après la fécondation pour se poursuivre tout au long de la période gestationnelle. La plupart de ces adaptations surviennent en réponse à des stimuli physiologiques fournis par le fœtus et sont donc complètement réversibles suite à l'accouchement.

1.1.1 Chez la femme

Les principales modifications hémodynamiques induites par la grossesse sont une augmentation du débit cardiaque ainsi qu'une rétention d'eau et de sel menant à une expansion volémique. De plus, une diminution de la résistance vasculaire périphérique et de la pression artérielle est observée. Ces changements s'amorcent précocement au cours de la grossesse, atteignent leur maximum au cours du second trimestre et demeurent relativement stables jusqu'à l'accouchement [111].

Le débit cardiaque est fonction de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique. Étant donné l'augmentation modérée de la fréquence cardiaque, la majeure partie de l'accroissement du débit cardiaque maternel est due à la variation du volume d'éjection systolique qui augmente graduellement à partir de la 8^e semaine de grossesse. Ces modifications entraînent une hausse majeure d'environ 30 à 50% du débit cardiaque dès le premier trimestre de la grossesse, assurant ainsi l'augmentation du débit utéro-placentaire indispensable à la croissance fœtale [58;78;124]. Parallèlement, l'accroissement du débit cardiaque est associé à une expansion volémique d'approximativement 40% pendant la grossesse qui est principalement consécutive à une rétention accrue de sodium et d'eau par les tubules rénaux en raison de la suractivation du système rénine-angiotensine (SRA) et de l'importante production d'aldostérone qui s'ensuit. Les œstrogènes et la gonadotrophine chorionique humaine (*human chorionic gonadotrophin* : hCG) d'origine placentaire sont impliqués dans ce phénomène. La réabsorption sodée demeure cependant physiologiquement régulée, car un apport sodique supplémentaire ne produit pas d'expansion volémique additionnelle. Par ailleurs, l'expansion volémique est étroitement corrélée au poids du fœtus [78;111;262].

La pression artérielle est le produit du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique. Malgré l'importante augmentation du débit cardiaque, la pression artérielle diminue au cours du premier trimestre de grossesse pour atteindre son nadir entre les 24^e et 32^e semaines. Ceci est possible en raison d'une réduction de la résistance vasculaire périphérique. Les mécanismes sous-jacents à ce concept sont cependant peu connus. Il est toutefois accepté que les hormones d'origine ovarienne et placentaire jouent un rôle dans ces changements. Il est entre autres question des œstrogènes, de la progestérone, des prostaglandines et du monoxyde d'azote (*nitric oxide* : NO) dont les actions dilatatrices sur les vaisseaux sanguins maternels contribueraient à la diminution de la résistance vasculaire périphérique. Par ailleurs, la réduction de la résistance périphérique serait en partie due au fait que les vaisseaux maternels sont réfractaires aux effets presseurs de certaines hormones constrictrices comme l'angiotensine II (AII) et les catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine) et ce, malgré l'importante activation du SRA et du système nerveux autonome sympathique. La création d'un circuit de faible résistance dans l'utérus gravide, la circulation utéro-placentaire, influencerait également la résistance vasculaire périphérique en agissant comme un shunt vasculaire à la circulation maternelle. En effet, les vaisseaux sanguins utérins dont la croissance s'effectue par un remodelage cellulaire hypertrophique et hyperplasique de la paroi artérielle [57] sont moins sensibles aux agents presseurs et aux changements de l'activité du système nerveux autonome. L'absence de régulation à

ce niveau permet de maintenir le flot sanguin nécessaire à la croissance et au bien-être du fœtus [225;262].

1.1.2 La rate comme modèle de la grossesse chez l'humain

Le rat est l'un des modèles animaux les plus fréquemment utilisés pour l'étude de la grossesse chez l'humain. Ceci est dû au fait que la gestation chez la rate est accompagnée de changements similaires à ceux observés chez la femme, notamment par rapport à l'expansion volémique et aux modifications hormonales et hémodynamiques cardiaques et rénales [23;75]. La période de gestation relativement courte, près de trois semaines, en fait également un modèle attrayant. De façon générale, les adaptations physiologiques survenant au cours du second trimestre de la grossesse chez la femme se produisent pendant la dernière semaine de gestation chez la rate (Figure 1).

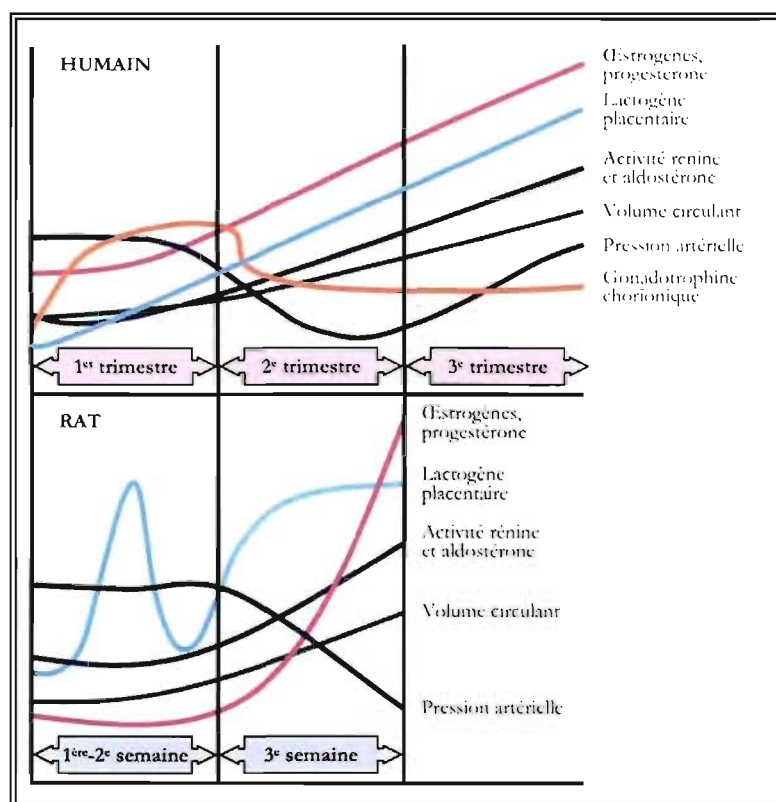


Figure 1. Comparaison de la grossesse chez la femme et de la gestation chez la rate.

Adaptée de [17;23;105].

1.2 LE DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA

Le placenta est un organe transitoire dont l'un des principaux rôles est d'assurer les échanges physiologiques entre la mère et son fœtus. Pour ce faire, les circulations fœtale et maternelle s'y trouvent dans une situation d'étroite proximité, mais demeurent séparées par la barrière placentaire qui sert d'interface aux échanges. Le placenta agit également comme glande endocrine par la sécrétion d'hormones qui sont normalement d'origine ovarienne, hypophysaire et hypothalamique.

1.2.1 La chronologie du développement placentaire

L'implantation du blastocyste dans la paroi utérine est une étape fondamentale et cruciale du développement embryonnaire. Chez la femme, ce processus s'étend du 6^e-7^e jour de développement embryonnaire au moment de l'éclosion du blastocyste jusqu'à l'ébauche de la circulation placentaire primitive au milieu de la seconde semaine de développement. La nidation de l'embryon humain est dite intersituelle, le blastocyste étant complètement enfoui dans la muqueuse utérine. Ceci permet l'isolement de l'embryon par rapport au monde extérieur, mais assure également son étroit contact avec l'organisme maternel qui garantit l'apport nutritif indispensable à son développement. Chez la rate, le blastocyste se forme tout juste avant son attachement et son implantation survenant autour du 5^e jour de gestation (G). Puisque le blastocyste continue de saillir de façon plus ou moins marquée dans la cavité utérine, l'implantation est qualifiée d'excentrique [135].

La placentation définit la création du placenta – organe unique puisqu'il est temporaire et issu de deux organismes différents – mais aussi les modifications anatomiques et morphologiques des tissus maternels qui supportent le développement placentaire. De type hémochorial, le placenta chez la femme est constitué d'une seule couche de cellules trophoblastiques alors que chez la rate, il en existe trois. Il n'existe cependant aucune indication en faveur d'une relation entre le nombre de couches tissulaires séparant les circulations maternelle et fœtale et l'efficacité du transfert placentaire. Chez la femme comme chez la rate, ces deux circulations sont en contact étroit, l'érosion des vaisseaux maternels permettant l'immersion des cellules trophoblastiques dans le sang maternel [135].

En plus de la courte période de gestation des rongeurs, ces similarités font de la rate un modèle animal de choix pour l'étude de la grossesse et de ses complications [45;269].

1.2.1.1 *Chez la femme*

Dans la cavité utérine, le blastocyste – composé de deux populations cellulaires distinctes, les trophoblastes et l'embryoblaste – se libère de la zone pellucide et interagit directement avec l'endomètre maternel auquel il s'appose et adhère par un système d'interpénétration entre les microvillosités de la surface apicale des cellules trophoblastiques les plus externes et celles des cellules épithéliales utérines (Figure 2). Les cellules trophoblastiques entament alors leur prolifération et forment deux couches cellulaires, le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste. En profondeur, le cytotrophoblaste, siège d'une activité mitotique intense, consiste en une couche interne irrégulière de cellules mononucléées. En périphérie, le syncytiotrophoblaste forme une couche multinucléée sans limite cellulaire distincte, le syncytium, qui provient de la fusion des cellules externes du cytotrophoblaste. Le syncytiotrophoblaste possède des capacités enzymatiques lytiques et sécrète des facteurs qui lui permettent d'induire l'apoptose des cellules épithéliales de la muqueuse utérine, de traverser la lame basale ainsi que de pénétrer dans le stroma sous-jacent et ses composantes (glandes endométriales et capillaires utérins). Parallèlement, la muqueuse utérine se modifie sous l'influence de ces divers facteurs et subit la réaction déciduale. Au cours de la seconde semaine post-fécondation, de larges lacunes initialement gorgées de fluides tissulaires et de sécrétions utérines apparaissent dans le syncytiotrophoblaste (Figure 2). Par confluence, elles se fusionnent et se remplissent de sang maternel suite à l'érosion progressive des capillaires utérins par le syncytiotrophoblaste, achevant la mise en place de la circulation utéro-placentaire primitive [135;173;233;263].

Pendant la seconde semaine post-fécondation, une première vague de prolifération des cellules du cytotrophoblaste s'insinue dans les travées de syncytiotrophoblaste, créant l'ébauche des villosités chorioniques (villosités primaires) qui s'ancrent dans l'utérus. À leur tour, les colonnes de cellules du cytotrophoblaste sont envahies par une prolifération mésenchymateuse d'origine embryonnaire, assurant la croissance et l'arborisation des villosités (villosités secondaires). Parallèlement, des vaisseaux sanguins se développent à l'intérieur de l'axe mésenchymateux des villosités (villosités tertiaires) et se connectent avec ceux de l'embryon. Ainsi, la constitution définitive des villosités choriales et la fonctionnalité de la circulation fœto-placentaire apparaissent environ trois semaines après la fécondation. Les villosités peuvent être flottantes au sein des chambres intervilleuses dérivées de l'anastomose des lacunes du syncytiotrophoblaste ou ancrées dans l'utérus maternel, servant alors de villosités crampons (Figure 3). Les circulations maternelle et fœtale, bien qu'en étroite relation,

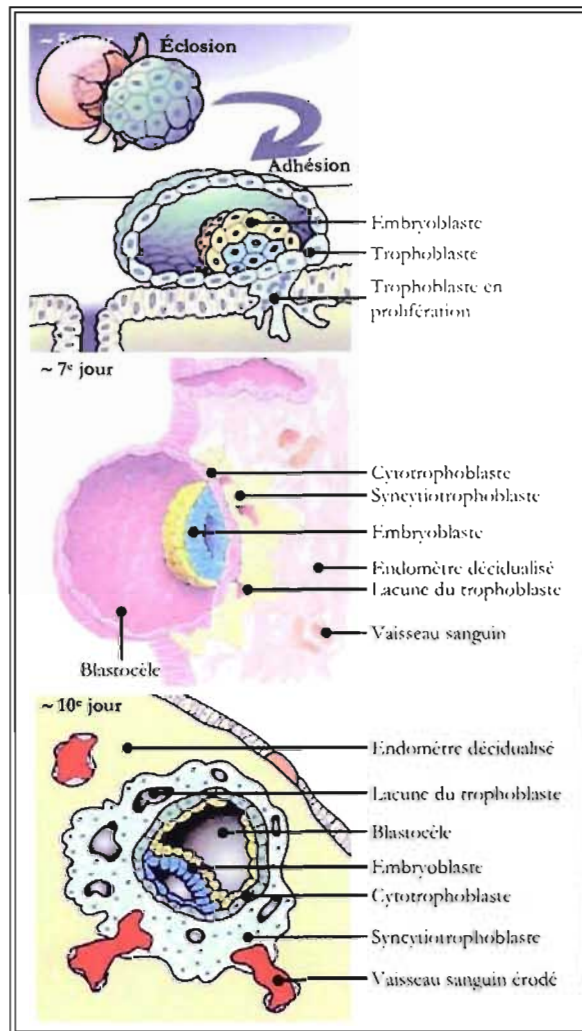


Figure 2. L'adhésion et l'implantation du blastocyste.

Adaptée de [233;263].

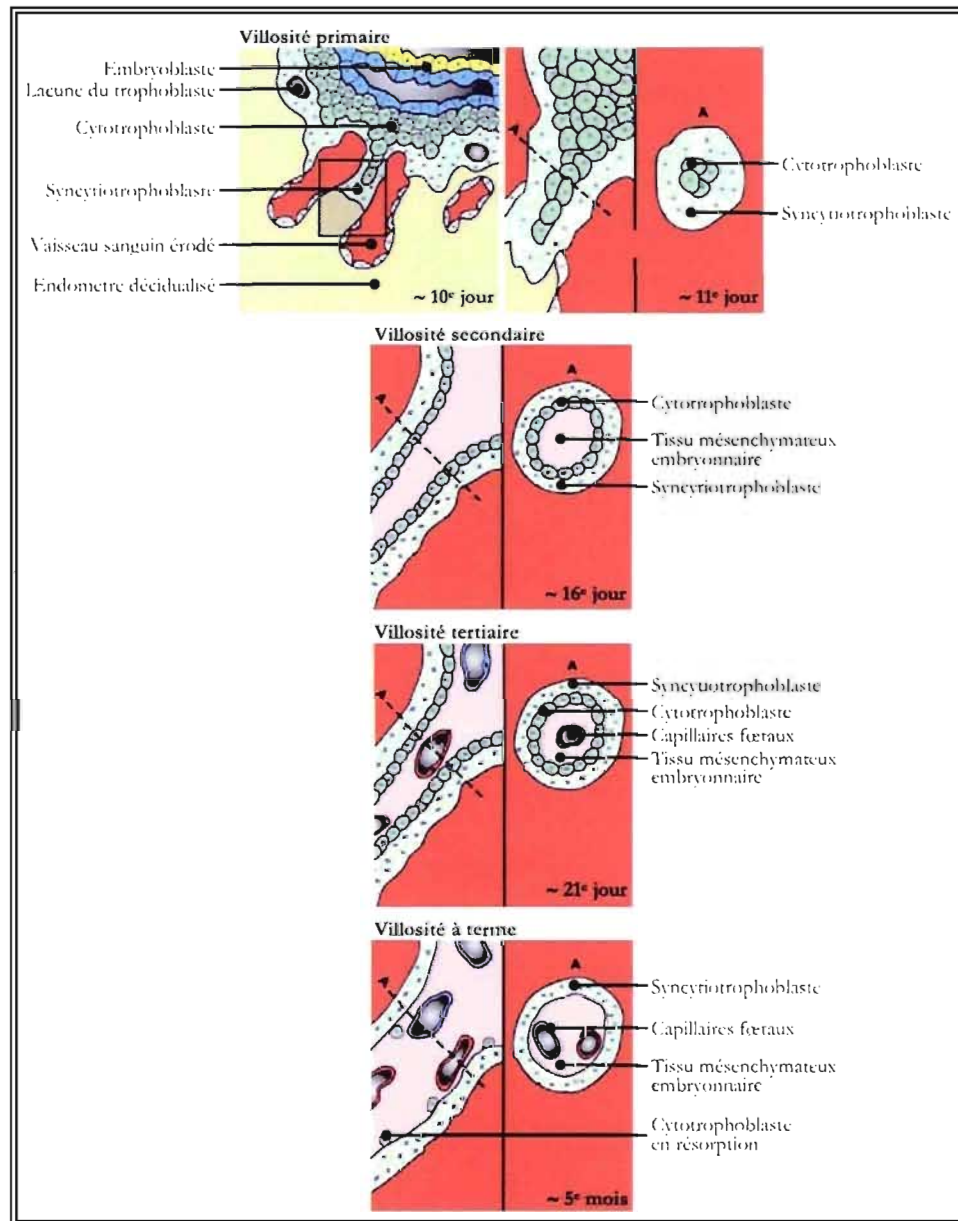


Figure 3. Schéma simplifié des stades de développement des villosités placentaires chez l'humain.

Adaptée de [233].

demeurent séparées par la barrière placentaire constituée de l'endothélium des capillaires placentaires, du mésenchyme qui les entoure, du cytotrophoblaste villositaire – qui se résorbera avec la progression de la grossesse – et du syncytiotrophoblaste (villosités à terme). Ce dernier, en contact direct avec le sang maternel, constitue la principale interface fœto-maternelle et possède de nombreuses fonctions sécrétrices et endocrines indispensables au développement de l'unité fœto-placentaire [171]. Les cellules du cytotrophoblaste situées à la base des villosités crânielles, le cytotrophoblaste extravilleux, conservent leur potentiel prolifératif et migratoire, conduisant la seconde vague d'invasion trophoblastique. Elles colonisent alors la décidua ainsi que le premier tiers du myomètre et persistent dans la paroi utérine où elles se différencient en cellules géantes bi- ou trinuéclées (invasion interstitielle) ou migrent de façon spécifique vers la paroi des artères utérines spiralées où elles deviennent endovasculaires (invasion endovasculaire). Survenant entre les 6^e et 18^e semaines post-fécondation, l'invasion endovasculaire (Figure 4) est responsable de la transformation de la tunique élastique des artères utérines spiralées en une paroi fibreuse qui offre peu de résistance au flux maternel [9;144;211]. Ce remodelage permet la création de la circulation utéro-placentaire définitive.

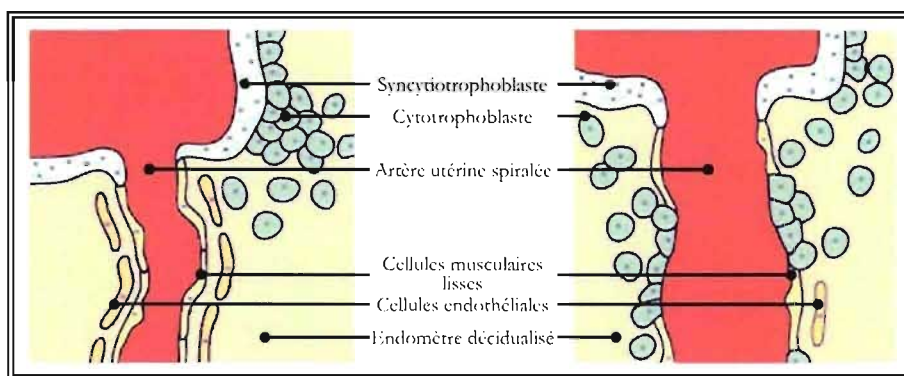


Figure 4. L'invasion endovasculaire.

Adaptée de [233].

Le développement du placenta se poursuit tout au long de la gestation pour s'adapter aux besoins métaboliques de l'embryon en croissance. En fait, il n'atteint sa maturité que vers la moitié de la grossesse où il fonctionne alors à pleine capacité. Ainsi, la placentation implique le développement de deux régions physiologiquement et anatomiquement distinctes, la plaque chorionique et la plaque basale. La plaque chorionique contient les villosités placentaires baignant dans les espaces intervillositaires gorgés de sang maternel. Bordant la surface maternelle de la plaque chorionique, la plaque basale est

formée de la décidua basilaire et du myomètre décidualisé qui sont traversés par les vaisseaux maternels se déversant dans les espaces intervilleux [107;144;233].

1.2.1.2 Chez la rate

Une fois fécondés, les ovocytes de la rate se transforment en blastocystes à G4 où ils atteignent la cavité utérine. À l'image du blastocyste humain, le blastocyste de rat est constitué d'une couche externe de cellules trophoblastiques tapissant une cavité dans laquelle se trouve l'embryoblaste. Grâce aux contractions du myomètre de chacune des deux cornes utérines, les blastocystes s'y dispersent à intervalles réguliers et s'y implantent à G5. Déjà, le stroma de l'endomètre montre certaines caractéristiques de la réaction déciduale. Chaque corne utérine présente deux côtés, la face mésométriale où se développe le placenta et la face anti-mésométriale où s'implante le blastocyste. Ainsi, contrairement à l'implantation du blastocyste humain au cours de laquelle les cellules trophoblastiques du pôle embryonnaire prolifèrent et envahissent l'endomètre, ce sont plutôt les cellules trophoblastiques du pôle mésométrial du blastocyste de rat qui se divisent et pénètrent la muqueuse utérine (Figure 5). Cette invasion trophoblastique est principalement orientée vers le triangle mésométrial, une région utérine riche en vaisseaux sanguins dont le rôle ultime est de fournir les nutriments à l'unité fœto-placentaire. À G8, l'invasion de cellules trophoblastiques initie le développement d'un cône préplacentaire, le Träger, induisant la formation du placenta. À peu près simultanément, des cellules trophoblastiques géantes ainsi que des cellules du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste apparaissent à la périphérie de ce cône qui s'effacera complètement de l'ébauche placentaire à G12. Grâce à leur activité phagocytaire, les cellules trophoblastiques géantes envahissent la décidua. Elles migrent par la suite latéralement et vers la face anti-mésométriale de manière à former, à G11, une couche cellulaire qui enrobe entièrement l'embryon jusqu'au terme de la gestation. Parallèlement, des lacunes remplies de sang se forment au milieu des cellules du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste à partir desquelles se développe désormais le placenta. Par ailleurs, la réaction déciduale s'étend progressivement au myomètre utérin [29;75].

Ainsi, à G12, les couches cellulaires qui forment le placenta sont déjà définies, donnant au placenta une structure qu'il conservera jusqu'au terme de la gestation [75]. Cinq couches morphologiquement distinctes sont identifiables : (1) le myomètre utérin décidualisé et (2) la décidua mésométriale, (3) les cellules trophoblastiques géantes situées à l'interface utéro-placentaire et (4) le spongiotrophoblaste

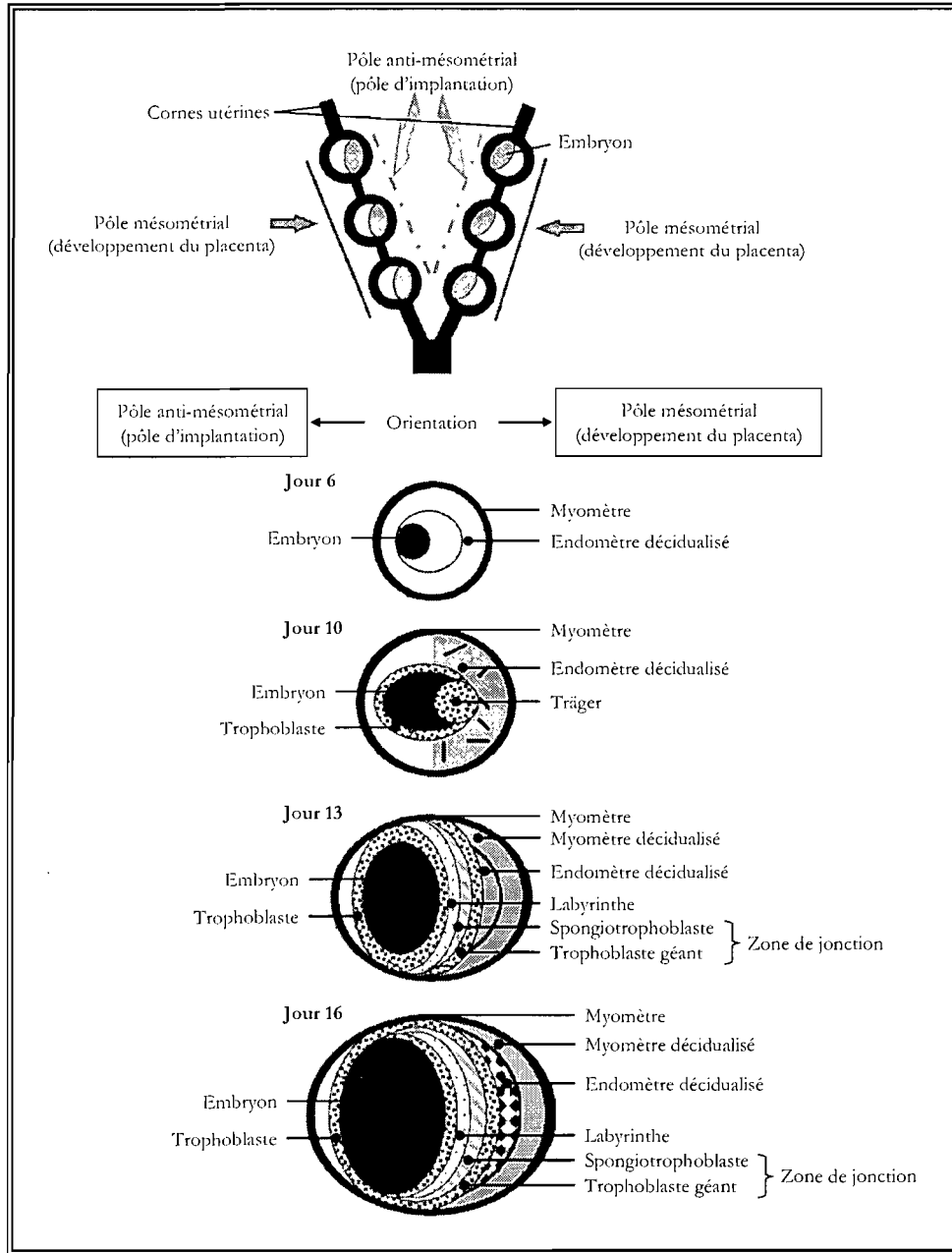


Figure 5. Le développement du placenta chez le rat.

Adaptée de [75].

qui forment ensemble la zone de jonction et finalement, (5) le labyrinthe localisé à l'interface fœtale. Ce dernier est constitué de cellules souches capables de se différencier en cellules trophoblastiques géantes ou de fusionner pour former le syncytiotrophoblaste. Analogue à la plaque chorionique chez la femme, le labyrinthe chez la rate est responsable des échanges entre la mère et son fœtus puisque les villosités chorioniques qui le composent baignent dans des lacunes de sang maternel (Figure 6). Ces villosités sont toutefois plus arborisées que celles présentes dans le placenta humain [107]. L'ultrastructure du labyrinthe de la rate est cependant quelque peu différente de celle de la plaque chorionique chez la femme en ce sens que les villosités chorioniques du labyrinthe sont recouvertes de trois couches de cellules trophoblastiques (placenta trichorial) contrairement à l'unique couche de syncytiotrophoblaste (placenta monochorial) qui tapisse celles de la plaque chorionique. Ainsi, les trophoblastes qui se situent à l'interface du sang maternel ne forment pas un syncytium, mais consistent plutôt en une couche de cytotrophoblaste. Cette couche est suivie de deux couches de syncytiotrophoblaste (syncytiotrophoblaste I et II), souvent perçues comme une structure unique en raison de leur étroite juxtaposition par des jonctions communicantes permettant un contact direct entre les cytoplasmes respectifs [107]. De plus, le labyrinthe du placenta de rat ne possède aucune activité endocrinienne contrairement au syncytiotrophoblaste du placenta humain, la production hormonale étant principalement assurée par les cellules trophoblastiques géantes de la zone de jonction [171].

Comme chez l'humain, l'invasion trophoblastique prend deux formes, interstitielle et endovasculaire. Le processus est cependant inversé, c'est-à-dire que l'invasion endovasculaire précède l'invasion interstitielle [210]. L'invasion endovasculaire dans le triangle mésométrial s'amorce aux alentours de G13 [45] alors que l'invasion interstitielle débute à G15 avec la pénétration des cellules du trophoblaste dans la décidua et le triangle mésométrial. Elle atteint son zénith à G18 après lequel elle décline, coïncidant avec la régression du site d'implantation vers la fin de la gestation [269].

1.2.2 Un survol des éléments impliqués dans le développement du placenta

Un apport adéquat en oxygène est crucial au développement normal du fœtus. Ainsi, la formation et le développement de vaisseaux sanguins au sein de l'unité fœto-placentaire et l'adaptation de la vasculature de l'utérus grâce à une importante dilatation sont nécessaires à l'assouvissement des besoins du fœtus. Le système vasculaire placentaire se développe par deux processus distincts et

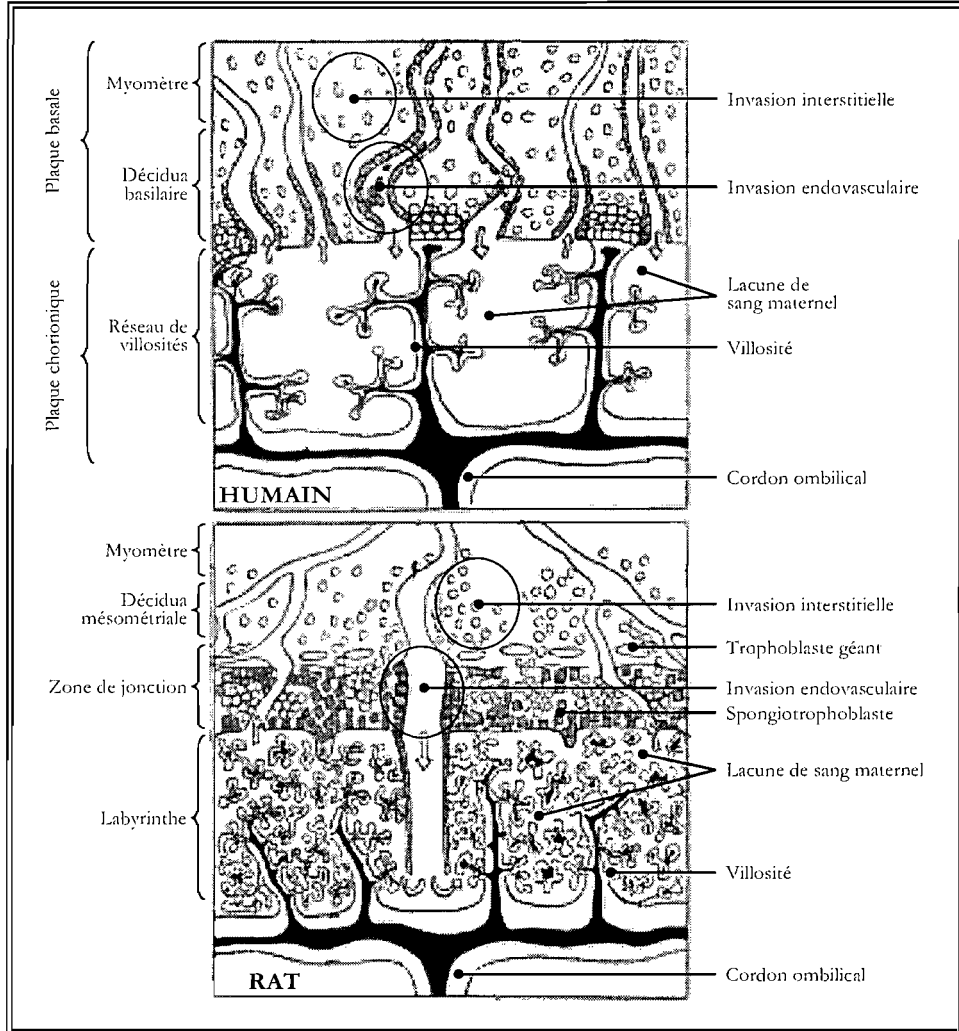


Figure 6. Comparaison du placenta chez l'humain et le rat.
Adaptée de [107].

subséquents : (1) la vasculogenèse où il y a formation *de novo* de vaisseaux à partir de cellules précurseuses, les hémangioblastes – les cellules précurseuses, entre autres, des cellules endothéliales fœtales – et (2) l'angiogenèse qui assure la croissance de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants [77;290]. L'oxygène apparaît comme un facteur primordial de la régulation de ces processus-clés [50] en raison du contrôle qu'il exerce sur la transcription de plusieurs gènes. À ce titre, le taux d'oxygène a été mis en cause dans la genèse de certaines complications de la grossesse, entre autres de la pré-éclampsie et de la RCIU [151]. Par ailleurs, le placenta est un tissu en constant remodelage où la prolifération et la différenciation des cellules côtoient l'apoptose qui joue un rôle essentiel au développement normal du placenta par son implication, entre autres, dans l'invasion et la différenciation trophoblastique ainsi que dans la transformation des artères utérines spiralées [255]. Lors de la pré-éclampsie et de la RCIU, une augmentation de l'apoptose placentaire a été mise en évidence, indiquant que l'altération de sa régulation peut contribuer à la pathophysiologie de ces complications [125;255]. De nombreuses autres molécules interviennent également dans la régulation du développement placentaire, incluant le NO^{*} et les espèces réactives dérivées de l'oxygène (*reactive oxygen species* : ROS) et de l'azote (*reactive nitrogen species* : RNS), de par leur rôle dans le maintien d'un circuit de faible résistance au niveau des circulations fœto-placentaire et utéro-placentaire ainsi que dans l'invasion trophoblastique et le remodelage des artères utérines spiralées [193;268].

1.2.2.1 La vasculogenèse et l'angiogenèse

Chez l'humain, la croissance vasculaire du placenta s'amorce autour du 21^e jour post-fécondation et se poursuit tout au long de la grossesse [145;290]. Les premiers signes de vasculogenèse sont observables au stade précoce des villosités tertiaires où des amas de cellules hémangioblastiques se distinguent du tissu mésenchymateux environnant [52]. Vers le 32^e jour post-fécondation, le réseau vasculaire du placenta poursuit son développement par angiogenèse avec l'élongation, la ramification, l'arborisation et le bourgeonnement des capillaires primitifs au sein des villosités chorioniques [52;145]. Plusieurs facteurs de croissance angiogéniques participent au développement et à l'extension de ce réseau vasculaire, notamment le facteur de croissance vasculaire endothéliale (*vascular endothelial growth factor* : VEGF) et le facteur de croissance placentaire (*placental growth factor* : PlGF) ainsi que leurs récepteurs [52]. La teneur locale en oxygène dans les chambres intervillieuses du placenta joue également un rôle important dans le développement de la vasculature placentaire [5;50]. En effet, au cours du premier trimestre de grossesse, celui-ci prend place dans un environnement relativement

pauvre en oxygène en raison de l'absence d'une circulation utéro-placentaire bien établie. Le remodelage des artères utérines spiralées lors de l'invasion trophoblastique endovasculaire entraîne l'établissement d'un flot sanguin continu, permettant une augmentation du niveau d'oxygène dans les chambres intervillieuses du placenta. Il a été proposé que cette élévation du taux d'oxygène soit perçue comme un signal permettant aux trophoblastes de passer de leur état prolifératif qui prévalait en condition hypoxique à un caractère invasif assurant la seconde vague d'invasion trophoblastique [5]. De plus, l'oxygène contrôlant l'expression de certains gènes, incluant ceux du VEGF et du PlGF, il intervient également dans la régulation de la vasculogenèse et de l'angiogenèse qui prennent place dans les villosités chorioniques placentaires.

Les facteurs de croissance vasculaire endothéliale. Les membres de la famille du VEGF – les seuls détectables dans le placenta étant le VEGF-A (ou VEGF) et le PlGF [52] – sont des mitogènes hautement spécifiques des cellules endothéliales vasculaires [227]. Les deux principaux récepteurs des membres de la famille du VEGF (*vascular endothelial growth factor receptor* : VEGFR) sont des récepteurs tyrosines kinases – le VEGFR1 fixant le VEGF et le PlGF et le VEGFR2 liant le VEGF – qui stimulent diverses voies de signalisation intracellulaires, responsables de la survie, de la prolifération et de la migration cellulaire ainsi que de la perméabilité et de la dilatation vasculaire [227]. Le VEGFR1 existe également sous forme soluble (*soluble vascular endothelial growth factor receptor 1* : sVEGFR1), résultat d'un épissage alternatif [149]. Le sVEGFR1 est formé du domaine extracellulaire, ce qui en fait un inhibiteur de l'activité due au VEGF/PlGF. Dans tous les cas, le VEGFR2 demeure le principal récepteur par lequel le VEGF assure ses actions (Figure 7), le VEGFR1 étant davantage perçu comme un partenaire de dimérisation ou une étape intermédiaire dans l'activation du VEGFR2 plutôt qu'un inducteur direct des voies de signalisation [227]. Le principal mécanisme de régulation de l'expression du VEGF est l'hypoxie par la liaison du facteur inductible par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor* : HIF) à l'élément de réponse à l'hypoxie (*hypoxia response element* : HRE) présent dans le promoteur du VEGF. Il existe cependant d'autres régulateurs de l'expression du VEGF tels que de nombreux facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires et certaines hormones [227]. L'expression du PlGF est également inductible par des stimuli proinflammatoires et par un environnement hypoxique, faisant toutefois intervenir un complexe de transcription différent de HIF [67]. Ainsi, dans le placenta humain [5;52] et de rat [56;197], le VEGF et le PlGF sont sécrétés par les trophoblastes. Le VEGF est également produit par les cellules déciduales de l'endomètre maternel. [280]. Alors que le VEGFR1 et le VEGFR2 se retrouvent à la surface des cellules endothéliales

vasculaires, seuls le VEGFR1 et sa forme soluble sont exprimés par les trophoblastes du placenta humain [5;52] et de souris [82]. De plus, des études *in vitro* ont démontré que les trophoblastes humains répondent à l'hypoxie en activant l'expression du VEGF et de ses récepteurs, mais en réduisant celle du PlGF [159].

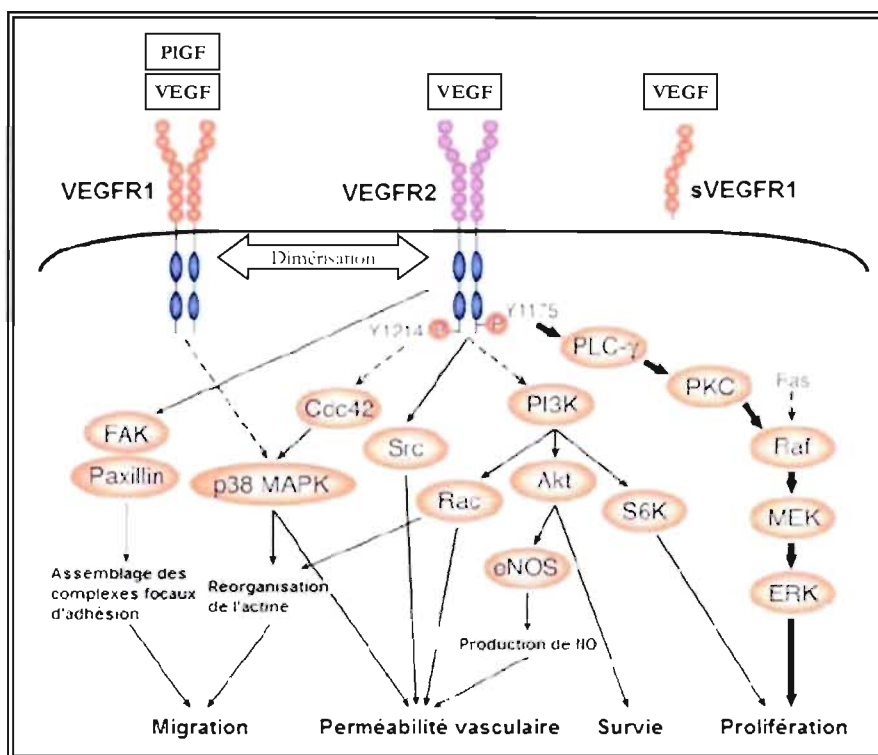


Figure 7. Diagramme illustrant les voies de signalisation induites par la liaison du VEGF et du PlGF à leurs récepteurs.
Adaptée de [257].

Leur implication dans le développement du placenta. L'expression adéquate du VEGF et de ses récepteurs est essentielle à la formation et au développement de la vasculature lors de l'embryogenèse puisque l'inactivation de l'un de ces gènes chez la souris entraîne une mort embryonnaire vers la migration [47;89;92;239]. En fait, la mutation nulle du *VEGFR2* chez l'embryon de souris [239] résulte en un défaut de la différenciation des hémangioblastes en leurs lignées cellulaires subséquentes alors que l'embryon de souris déficient en *VEGFR1* présente des lacunes dans la formation et l'assemblage des vaisseaux sanguins [92]. Il apparaît ainsi que le VEGF par le *VEGFR2* joue un rôle précoce dans la différenciation des cellules précurseurs alors que les effets du *VEGFR1* sont plus tardifs et interviennent dans l'assemblage du réseau vasculaire du placenta [5]. Ces observations sont

supportées par les patrons d'expression du VEGF, du PlGF et de leurs récepteurs dans le placenta humain. En effet, l'immunoréactivité du VEGF et du VEGFR2 est très intense en début de grossesse et décline avec sa progression alors que celle du PlGF et du VEGFR1 augmente jusqu'au terme de la grossesse [5]. Chez le rat, une augmentation progressive de l'expression du VEGF [119] et du PlGF [56] a cependant été démontrée dans le placenta, indiquant un rôle fonctionnel pour ces deux facteurs dans le développement placentaire. Plusieurs travaux ont mis en évidence une dysfonction de la régulation moléculaire de la vasculogenèse et de l'angiogenèse dans diverses complications de la grossesse, notamment dans la RCIU, expliquant les différences morphologiques et les patrons d'expression du VEGF, du PlGF et de leurs récepteurs dans ces placentas [179]. Par ailleurs, il a été suggéré que le VEGF participe à l'invasion trophoblastique en agissant à titre de facteur attractif [5], le VEGFR1 étant exprimé par les trophoblastes [52] et le VEGF, par les cellules déciduales de l'endomètre maternel [280].

1.2.2.2 L'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique finement régulé et essentiel au développement et au maintien du fonctionnement adéquat de tout organisme vivant. Chez les mammifères, plusieurs signaux externes peuvent activer deux voies d'induction de l'apoptose, la voie intrinsèque (ou mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou des récepteurs de mort). Ces voies semblent distinctes, mais convergent et des interactions entre elles par certaines protéines (p53, Bid et autres) ont été rapportées. La cascade apoptotique nécessite l'intervention de plusieurs éléments dont les principaux sont les caspases synthétisées sous forme de zymogènes, les procaspases. Suite à l'induction de l'apoptose, le zymogène est clivé par protéolyse, permettant l'homodimérisation de la caspase et son activation complète. Il existe deux groupes de caspases participant à la cascade apoptotique, les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et effectrices (3, 6 et 7). Ces dernières sont responsables de l'activation/l'inhibition de différents substrats à l'origine des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose (formation de protubérances membranaires, perte de volume cellulaire, condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN, inversion des feuillettes membranaires sans perte d'intégrité, dégradation des protéines, formation de corps apoptotiques) et représentent le point de convergence des voies d'induction de l'apoptose [134;255]. Au cours de la grossesse, l'apoptose joue un rôle important aussi bien lors de l'apposition et de l'adhésion du blastocyste à la muqueuse utérine qu'au moment de l'invasion et de la différenciation trophoblastiques [125;255].

La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque). L'activation de la voie extrinsèque (Figure 8) est assurée par la stimulation de récepteurs membranaires, les récepteurs de mort, par leur ligand respectif, les membres de la famille du facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*: TNF) qui comprend notamment le TNF- α , le Fas ligand et le ligand apparenté au TNF induisant l'apoptose (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*: TRAIL). Afin d'induire une réponse intracellulaire initiant la cascade apoptotique, les récepteurs de mort possèdent dans leur portion cytoplasmique un domaine de mort qui permet l'interaction avec des protéines adaptatrices contenant à la fois un domaine de mort et un domaine effecteur de mort. Ainsi, la fixation du ligand à son récepteur résulte en l'oligomérisation du complexe ligand-récepteur, favorisant le recrutement de molécules adaptatrices capables de lier les procaspases initiatrices 8 ou 10. La formation de ce complexe nommé complexe de signalisation induisant la mort (*death-inducing signalling complex*: DISC) initie l'activation enzymatique de l'apoptose par la stimulation des caspases effectrices [134;255].

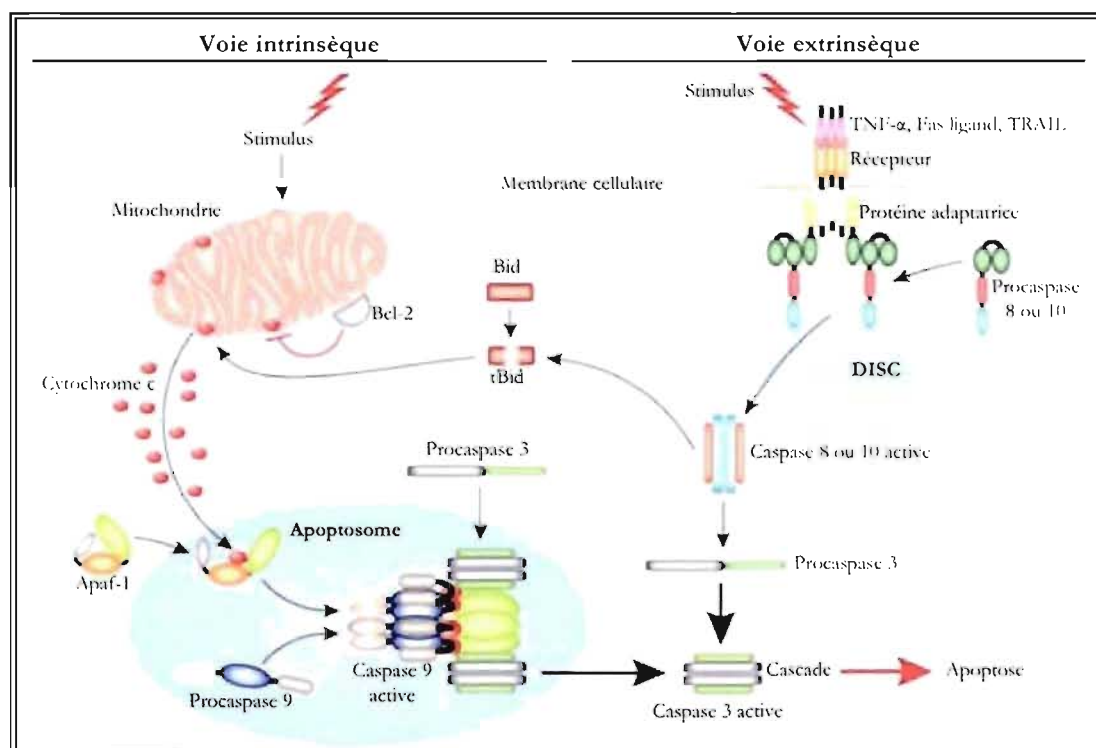


Figure 8. Voies extrinsèque et intrinsèque d'induction de l'apoptose.

Adaptée de [169].

La voie mitochondriale (voie intrinsèque). L'activation de la voie intrinsèque (Figure 8) est assurée par des signaux de stress cellulaire (diminution de l'apport en nutriments, accumulation de

ROS/RNS, déséquilibre ionique, désorganisation du cytosquelette, ADN endommagé, carence en facteurs de croissance et autres) qui convergent vers la mitochondrie. La relâche des protéines présentes dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, surtout du cytochrome c, suite à la perméabilisation de la membrane externe est perçue comme l'une des étapes majeures de l'induction de cette voie. La perméabilisation de la membrane externe est principalement contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. Cette famille de protéines est divisée en plusieurs groupes, incluant les protéines possédant une action anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-X_l, et autres) et celles dont l'action est pro-apoptotique (Bax, Bak et autres). Le relargage du cytochrome c dans le cytosol permet sa liaison au facteur activant les protéases apoptotiques (*apoptosis protease-activating factor 1* : Apaf-1) et à la procaspase 9, générant un complexe appelé apoptosome qui recrute et active les caspases effectrices [134;255]. Par ailleurs, le réticulum endoplasmique peut participer à l'apoptose induite par voie intrinsèque où les principaux stimuli sont le mauvais assemblage ou repliement des protéines et la perturbation de l'homéostasie calcique [134].

Son implication dans le développement du placenta. Des études indiquent que le remodelage des artères utérines spiralées est assuré par l'apoptose des cellules qui les composent. En effet, il a été montré que la culture de trophoblastes dans la lumière d'artères spiralées isolées non modifiées entraîne la perte de l'endothélium [16] et des cellules du muscle lisse vasculaire [115] par un mécanisme apoptotique, révélant la participation active des trophoblastes dans le remodelage des artères utérines. L'apoptose participe aussi à la différenciation et au renouvellement des cellules trophoblastiques du placenta. Le pourcentage de trophoblastes en apoptose augmente avec la progression de la grossesse, suggérant une régulation développementale de ce phénomène [246]. Plusieurs composantes de la cascade apoptotique sont exprimées différemment dans le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste. En fait, il apparaît que la cascade apoptotique est initiée dans le cytotrophoblaste et est complétée dans le syncytiotrophoblaste, indiquant que l'apoptose et la différenciation des trophoblastes sont des événements interdépendants. Ainsi, l'initiation de l'apoptose dans les cellules du cytotrophoblaste stimulerait leur différenciation et leur fusion afin de former le syncytiotrophoblaste alors que l'exécution de l'apoptose au sein du syncytiotrophoblaste permettrait son constant renouvellement [125;255].

1.2.2.3 Le monoxyde d'azote

Le NO^{*}, une RNS produite par les synthèses du NO^{*} (*nitric oxide synthase* : NOS), est un important modulateur des réponses cellulaires dans une variété de tissus, incluant ceux du système reproducteur. Dans le placenta, le NO^{*}, par ses effets dilatateurs, contribuerait au maintien d'un lit vasculaire de faible résistance au niveau des circulations utéro-placentaire [195] et fœto-placentaire [213]. Il semble que le NO^{*} participe aussi à l'angiogenèse ainsi qu'à l'invasion trophoblastique et au remodelage des artères utérines spiralées [268]. Des études ont d'ailleurs démontré une dérégulation de l'expression des NOS dans les placentas de grossesses compliquées par la pré-éclampsie ou une RCIU [194;232].

La synthèse du monoxyde d'azote. Le NO^{*} est généré lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline par les NOS. Il en existe trois isoformes qui diffèrent de par leur structure et leur fonction. Exprimées constitutivement dans différents types cellulaires, la NOS endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase* : eNOS) et la NOS neuronale (*neuronal nitric oxide synthase* : nNOS) sont des enzymes dépendantes de la concentration calcique environnante. La NOS inductible (*inducible nitric oxide synthase* : iNOS) est quant à elle exprimée à des niveaux plus élevés lors de sa stimulation par des cytokines ou d'autres molécules inflammatoires et son activité est indépendante du calcium. Les mécanismes de régulation et d'activation des NOS font entre autres intervenir différentes hormones, la phosphorylation de résidus spécifiques ainsi que leur sensibilité au calcium [11]. Plusieurs études ont mis en évidence l'expression de la eNOS dans le placenta humain, plus particulièrement dans les syncytiotrophoblastes et les cellules endothéliales fœtales [44;65;192], et dans le placenta de rat [224;259]. Alors que les premiers travaux semblaient indiquer l'absence d'expression de la iNOS dans le placenta humain [106;156;230], une étude plus récente démontre qu'elle est détectable dans les trophoblastes [232] comme dans le placenta de rat [43;214;224;259]. La présence de nNOS dans le placenta demeure controversée, certaines équipes ne parvenant pas à la détecter [6;224] alors que d'autres la localisent dans les cellules trophoblastiques [230].

Son implication dans la circulation placentaire et l'invasion trophoblastique. Le NO^{*} participerait au développement d'un circuit de faible résistance au niveau de la circulation utéro-placentaire en promouvant l'invasion endovasculaire et le remodelage des artères utérines spiralées [268]. Ce rôle demeure néanmoins controversé en raison d'études qui démontrent l'absence [167;168] ou la présence [174] d'expression de la eNOS dans les cellules invasives du cytotrophoblaste

extravilleux. Dans tous les cas, le NO[•] produit par le placenta prévient l'adhésion et l'aggrégation plaquettaire dans les chambres intervillieuses [268]. Par ailleurs, le fait que la synthèse de NO[•] soit couplée à la signalisation du VEGF par l'intermédiaire de la eNOS ou de la iNOS [154] laisse présager une fonction du NO[•] dans l'angiogenèse placentaire [268].

1.2.2.4 Le stress oxydatif et nitrosatif

Le stress oxydatif (causé par les ROS) et nitrosatif (engendré par les RNS) résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives et la capacité des systèmes antioxydants de les éliminer. La présence en trop grande quantité de ces espèces réactives affecte plusieurs composantes cellulaires majeures, incluant les lipides, les protéines et l'ADN [72].

La grossesse en elle-même est perçue comme un état de stress oxydatif, conséquence d'une activité métabolique mitochondriale accrue – en raison de la multiplication des mitochondries avec l'accroissement de la masse placentaire – et de l'affaiblissement du pouvoir des systèmes antioxydants maternels. Néanmoins, l'environnement placentaire tente de compenser cet état en induisant ses propres mécanismes de protection contre les espèces réactives au fur et à mesure que progresse la grossesse [49]. Aussi, un stress oxydatif/nitrosatif supérieur à celui normalement présent chez la femme enceinte est lié à des complications majeures de la grossesse telles que la pré-éclampsie, le diabète gestationnel et la RCIU. Ces conditions affectent la fonction placentaire, tant au niveau de la prolifération et de l'apoptose des trophoblastes qu'au niveau de l'angiogenèse placentaire [193].

Les espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote et leurs dégâts cellulaires. La ROS la plus commune dans l'organisme est l'anion superoxyde (O₂^{•-}), principalement généré par la fuite d'électrons (environ 1-2%) au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, mais aussi par certaines enzymes comme les oxydases membranaires (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate [NADPH] oxydase, xanthine oxydase et autres) et les cytochromes P450 (CYP) dépendants du NADPH. La réactivité de l'O₂^{•-} lui est conférée par sa paire d'électrons libres, permettant la production d'autres ROS, incluant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyl (OH[•]). L'O₂^{•-} peut également interagir avec d'autres espèces réactives comme le NO[•], formant alors le peroxy-nitrite (ONOO⁻). Le NO[•] et le ONOO⁻ font à présent partie de ce qui est appelé les RNS. Alors que la formation contrôlée d'espèces réactives par la cellule joue un rôle important dans la modulation de plusieurs

fonctions physiologiques, y compris de l'expression des gènes et de la signalisation intracellulaire, la production non maîtrisée de ces molécules mènent à une série d'événements visant l'altération aléatoire des protéines, des lipides et de l'ADN [72;193;265]. L'existence d'un stress oxydatif /nitrosatif placentaire est maintenant reconnue [193]. Il apparaît que la NADPH oxydase et la chaîne respiratoire mitochondriale contribuent de façon significative à la formation d' $O_2^{\cdot-}$ dans le placenta. Par ailleurs, certains travaux révèlent une augmentation [64], sinon un maintien [259], de la synthèse de NO^{\cdot} avec la progression de la gestation chez le rat. Cette disponibilité en NO^{\cdot} jumelée à la production accrue d' $O_2^{\cdot-}$ favorise la formation de $ONOO^-$ qui devient détectable dans le placenta [193;268].

Les systèmes antioxydants. Afin de protéger la cellule et les tissus des effets toxiques d'une importante génération d'espèces réactives, il existe plusieurs systèmes antioxydants, incluant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ainsi que la glutathion peroxydase et la glutathion réductase [72]. La SOD – dont trois isoformes ont été identifiés chez l'humain : la SOD (cuivre/zinc) cytosolique, la SOD (manganèse) mitochondriale et la SOD extracellulaire – représente la première ligne de défense contre les ROS. Elle est responsable de l'inactivation rapide de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 [176]. S'il est voué à la dégradation, le H_2O_2 est converti en eau par la catalase ou par la glutathion peroxydase, cette dernière étant régénérée par la glutathion réductase [72;166]. Ces différents systèmes antioxydants, parmi les plus connus, sont tous présents dans le placenta [193] où leur expression est différentielle selon – probablement – le degré d'oxygénation du tissu, la région centrale du placenta étant bien oxygénée et riche en antioxydants par rapport à la périphérie [118].

Le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans le développement placentaire. Les cellules du cytotrophoblaste répondent à des changements de la teneur en oxygène en modifiant leur comportement. Elles présentent en effet un caractère prolifératif en situation d'hypoxie, condition qui prévaut lors du premier trimestre de grossesse, alors qu'elles démontrent des propriétés invasives lorsque la teneur en oxygène augmente au moment de la mise en place de la circulation utéro-placentaire définitive [5;193]. Des travaux ont montré que l'expression de certains systèmes antioxydants, notamment de la SOD mitochondriale, est diminuée pendant le premier trimestre de grossesse [120], révélant une production accrue d'espèces réactives. Ainsi, la présence d'hypoxie et de stress oxydatif pendant la grossesse précoce aurait pour effet de potentialiser la prolifération des cytotrophoblastes [193]. Ce contexte d'hypoxie placentaire entraînant un stress oxydatif favoriserait

l'angiogenèse par l'intermédiaire du VEGF [193]. Par ailleurs, la génération d'espèces réactives [190] et l'hypoxie [127] possèdent le potentiel d'induire l'apoptose des trophoblastes en culture, révélant l'implication de ces mécanismes dans la régulation de la différenciation et du renouvellement des cellules trophoblastiques. Néanmoins, l'apoptose est augmentée dans les placentas issus de grossesses compliquées par la pré-éclampsie ou la RCIU [125;255] et des études démontrent que ce phénomène serait conséquent à un stress oxydatif plus élevé [131] ou à une hypoxie qui se prolonge au-delà du premier trimestre [71].

1.2.3 Les échanges fœto-maternels : le transport du glucose

Le placenta est un tissu métaboliquement actif qui extrait l'oxygène et les nutriments fournis par la circulation utérine (1) par diffusion passive limitée par le flot sanguin placentaire et la surface d'échange, (2) par diffusion facilitée par une protéine de transport selon un gradient de concentration, (3) par transport actif par une protéine de transport, contre un gradient de concentration requérant une consommation d'énergie ou (4) par transport vésiculaire impliquant les processus d'exocytose et d'endocytose [27;233]. Le transfert placentaire augmente avec la progression de la grossesse de manière à supporter la croissance fœtale [245].

Le glucose représente le substrat primaire du métabolisme oxydatif du fœtus et donc, sa principale source d'énergie. Ainsi, l'efficacité du transfert placentaire de glucose est cruciale au soutien du développement fœtal et à sa survie *in utero* puisque le fœtus ne synthétise des quantités appréciables de glucose que vers la fin de la grossesse, voire même après la naissance, chez l'humain comme chez le rat [141].

Le transfert placentaire du glucose s'effectue par diffusion facilitée et est donc assuré par une famille de protéines de transport, les transporteurs de glucose (*glucose transporter* : GLUT) dont les 14 membres identifiés jusqu'à maintenant sont divisés en trois sous-familles selon les similitudes de leur séquence génomique [231]. Chez l'humain, les isoformes 1, 3 et 4 sont exprimés dans le placenta [126] alors que seuls les GLUT1 et 3 sont présents dans le placenta de rat [243]. Chez l'humain, il apparaît que le transport du glucose est principalement assuré par le GLUT1 dont l'expression est majoritaire dans le syncytiotrophoblaste au sein duquel il est préférentiellement localisé dans la membrane apicale pourvue de microvillosités baignant dans le sang maternel. Le GLUT1 est

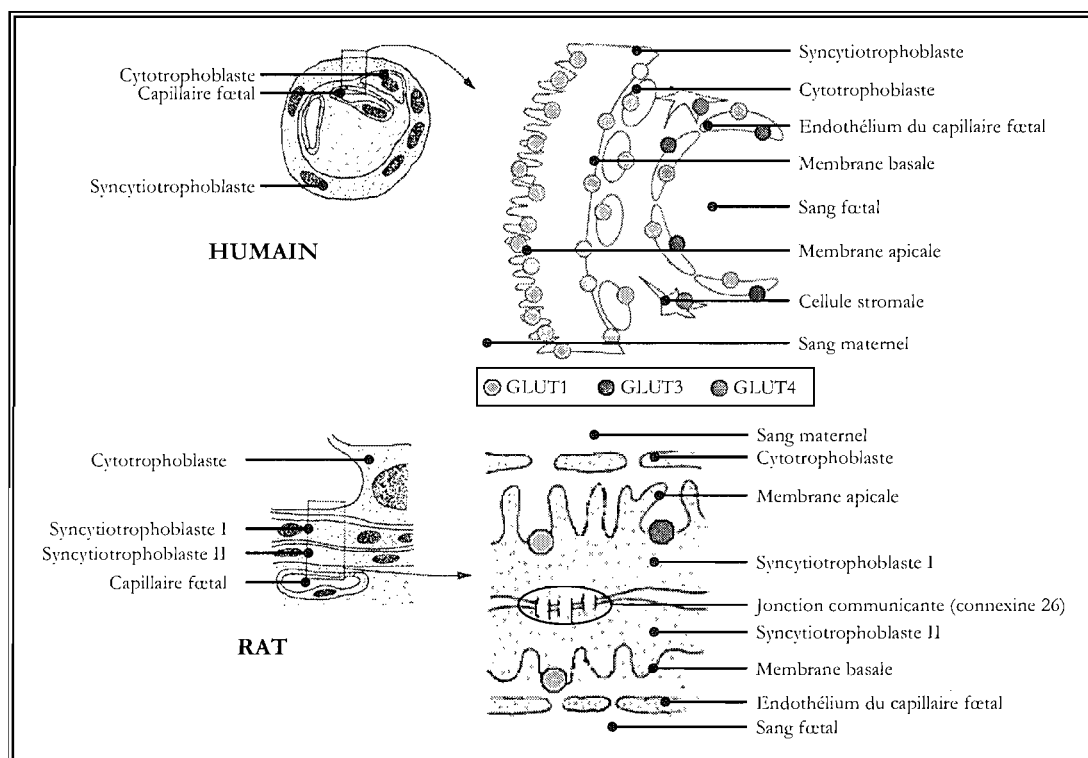


Figure 9. Les voies du transport du glucose dans le placenta humain et de rat.

Adaptée de [126;258].

sazégalemment retrouvé dans les cytotrophoblastes. Les cellules endothéliales de la vasculature fœtale expriment quant à elles les isoformes 1 et 3. Le GLUT4 est détecté dans les cellules stromales présentes dans le tissu mésenchymateux. Ainsi, chez l'humain (Figure 9), le glucose présent dans les lacunes de sang maternel franchit la membrane apicale du syncytiotrophoblaste par le GLUT1, traverse le cytoplasme du syncytiotrophoblaste par diffusion passive et passe au travers la membrane basale du syncytiotrophoblaste par le GLUT1. Le glucose pénètre finalement la circulation fœtale par les GLUT1 et 3 [126;258]. Chez le rat, l'expression des GLUT1 et 3 est localisée à la membrane apicale du syncytiotrophoblaste I contiguë aux tissus maternels alors que la membrane du syncytiotrophoblaste II adjacente au syncytiotrophoblaste I n'exprime que le GLUT3 et que la membrane basale du syncytiotrophoblaste II juxtaposant les capillaires fœtaux ne contient que du GLUT1 [243]. De plus, les deux couches de syncytiotrophoblaste sont liées entre elles par des jonctions communicantes formées par la connexine 26 [244], permettant l'unification des cytoplasmes de manière à constituer une seule couche fonctionnelle. À partir de ces observations, un schéma expliquant le transfert placentaire du glucose chez le rat a été proposé (Figure 9). Ainsi, le glucose

diffuse librement au travers des cytotrophoblastes grâce aux nombreux pores qui percent leur cytosol et pénètre dans le syncytiotrophoblaste I par les GLUT1 et 3 présents à la membrane apicale. Le glucose est transféré dans le syncytiotrophoblaste II par les jonctions composées de connexine 26 et quitte le syncytiotrophoblaste II par le GLUT1 localisé à la membrane basale. Le glucose gagne finalement la circulation fœtale par diffusion passive au travers l'endothélium fenestré des capillaires fœtaux [243]. De cette façon, l'association de GLUT1 et de la connexine 26 servirait de machinerie fonctionnelle au transfert adéquat du glucose au travers de la barrière placentaire chez le rat. La présence du GLUT3 dans la membrane du syncytiotrophoblaste II adjacente au syncytiotrophoblaste I demeure toutefois encore obscure. Néanmoins, sa distribution asymétrique pourrait être primordiale pour prévenir la fuite de glucose dans les cas d'hypoglycémie maternelle, fournissant alors un milieu stable pour le fœtus en développement [243].

1.2.4 Les fonctions endocrines du placenta

Bien que la principale fonction du placenta réside dans le fait qu'il assure le transport de l'oxygène et des nutriments entre la mère et son fœtus, il est également un important producteur d'hormones et agit à ce titre de glande endocrine. Ainsi, le placenta humain sécrète des hormones stéroïdiennes, principalement de la progestérone et des œstrogènes, et des hormones peptidiques, notamment la hCG et l'hormone lactogène placentaire humaine (*human placental lactogen* : hPL), mais également des facteurs de croissance et des cytokines. Chez le rat, le placenta ne possède pas vraiment d'activité stéroïdogénique, mais produit plusieurs hormones peptidiques (Figure 10).

Les hormones stéroïdiennes. Chez plusieurs mammifères comme l'humain et le rat, la progestérone et les œstrogènes sont essentiels à l'établissement et au maintien de la grossesse ainsi qu'au développement et à la croissance embryonnaire [205]. D'abord ovarienne par le corps lutéal maintenu par la hCG, la synthèse d'hormones stéroïdiennes est progressivement supportée par le placenta chez l'humain. Le placenta ne possède toutefois pas toute la machinerie nécessaire à la stéroïdogénèse et dépend donc de précurseurs et d'intermédiaires maternels et fœtaux [202]. Ainsi, le syncytiotrophoblaste synthétise la progestérone à partir du cholestérol majoritairement fourni par le sang maternel et aromatise les androgènes produits par les surrénales de la mère et de son fœtus en produits œstrogéniques – estriol, estrone et estradiol – révélant l'étroite collaboration des compartiments placentaire et fœtal au cours de la grossesse [86;202]. Chez le rat, la synthèse des

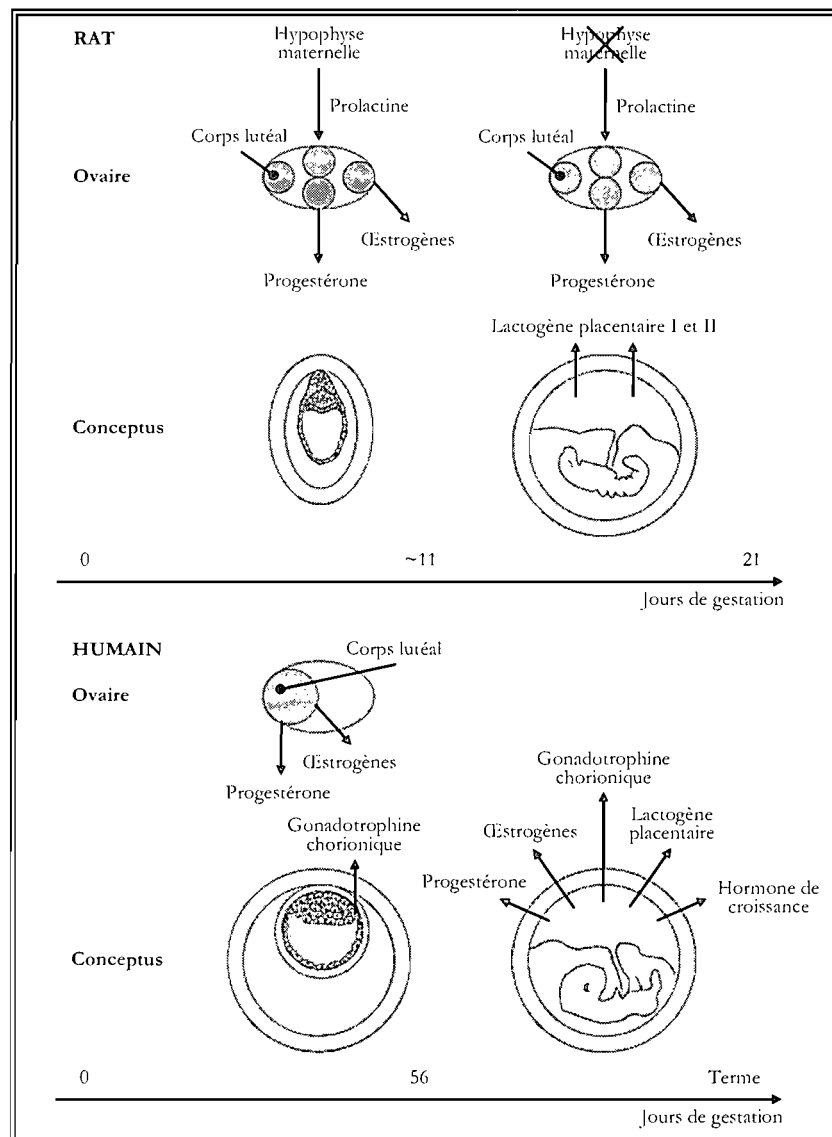


Figure 10. Comparaison des fonctions endocrines du placenta humain et de rat.
Adaptée de [171].

hormones stéroïdiennes est plutôt assurée par les ovaires pendant toute la durée de la gestation [28], même si le placenta, particulièrement les cellules trophoblastiques géantes, contribue de façon minime à la production de progestérone [28;172;177]. La fonction du corps lutéal est d'abord maintenue par la production de prolactine par l'hypophyse maternelle et dès la seconde semaine des gestation, par la biosynthèse de l'hormone lactogène placentaire de rat (*rat placental lactogen* : rPL) par les cellules trophoblastiques géantes [171;247].

Les hormones peptidiques. Chez l'humain, le premier marqueur de la différenciation trophoblastique et la première hormone produite par le syncytiotrophoblaste est la hCG. La chaîne α de la hCG est identique à la chaîne α de la thyrotrophine (*thyroid-stimulating hormone* : TSH) et des hormones folliculostimulante (*follicle-stimulating hormone* : FSH) et lutéinisante (*lutinizing hormone* : LH), toutes trois d'origine hypophysaire, et sa chaîne β partage une forte homologie de séquence avec la chaîne β de la LH [260]. Ces caractéristiques structurelles sont révélatrices du rôle de la hCG au cours de la grossesse. En effet, la hCG, au même titre que la LH, prolonge la vie du corps lutéal ovarien qui synthétise des quantités croissantes de stéroïdes sexuels jusqu'à ce que le placenta soit en mesure d'en assurer le relais [78;86;260]. Une faible proportion de hCG placentaire est tout de même sécrétée dans la circulation fœtale où elle est impliquée dans le développement, la croissance et la fonction des gonades et des surrénales [78;164;260]. De plus, des travaux suggèrent un rôle de la hCG dans la placentation où elle stimule la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes [68;242]. Chez les rongeurs, aucun gène codant pour les chaînes α et β de la CG n'a été détecté [48;175;261], même si diverses études proposent l'existence d'une hormone aux propriétés structurales [162] et fonctionnelles [32;48] similaires à la hCG. Le développement de la masse placentaire du syncytiotrophoblaste entraîne la production croissante de hPL dont l'action physiologique demeure controversée [171]. Il apparaît en outre que le hPL participe à l'adaptation de l'organisme maternel à la grossesse par la modulation de son métabolisme intermédiaire et au développement et à la croissance du fœtus par la stimulation de la production d'autres hormones telles que l'insuline, les facteurs de croissance similaires à l'insuline (*insulin-like growth factor* : IGF) et les corticostéroïdes [114]. Par ailleurs, le hPL est appuyée dans ses fonctions par une hormone de croissance (*growth hormone* : GH), également sécrétée par le syncytiotrophoblaste, qui s'apparente fortement à la GH hypophysaire [86;171]. Chez le rat, les cellules trophoblastiques géantes et les spongiotrophoblastes de la zone de jonction produisent plusieurs membres de la famille génique de la prolactine dont le rPL de type I et II qui semblent jouer le(s) même(s) rôle(s) que le hPL, mais ne synthétisent pas de GH [247].

1.3 L'ENVIRONNEMENT INTRA-UTÉRIN ET SES RÉPERCUSSIONS

Les maladies chroniques surviennent avec l'âge. Depuis longtemps, les scientifiques expliquent le développement de ces maladies par des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et les modes de vie. Cependant, un autre facteur de risque émerge, l'environnement intra-utérin défavorable. En effet, des études épidémiologiques ont mis en évidence une association entre le faible poids de naissance, ou RCIU, et l'apparition de ces maladies chroniques, la RCIU étant considérée comme un indice de la qualité de l'environnement intra-utérin. Ces travaux sont à l'origine d'une théorie : l'origine développementale des maladies de l'adulte.

1.3.1 La restriction de croissance intra-utérine

Selon la définition employée, la RCIU est une complication de la grossesse qui affecte avec une sévérité variable environ 5% de la population obstétricale générale. Ces retards sont à l'origine d'une importante mortalité et morbidité périnatale, arrivant derrière la prématurité [101;204]. Ses causes étant nombreuses, la physiopathologie de la RCIU est complexe [108]. Il importe cependant de comprendre les mécanismes sous-jacents à cette complication, la RCIU étant reconnue comme un facteur de risque du développement des maladies chroniques [181].

1.3.1.1 La définition

Aux États-Unis, un nouveau-né qui souffre de RCIU est un nourrisson dont le poids de naissance se situe sous le 10^e percentile pour l'âge gestationnel par rapport aux courbes pondérales d'une population témoin [222]. Cette définition doit toutefois être nuancée puisqu'elle englobe aussi les bébés considérés petits pour leur âge gestationnel (*small for gestational age*), un terme descriptif qui signifie que la taille du fœtus et son poids de naissance se trouvent sous les limites prévues. Il a en effet été estimé qu'environ 50 à 70% des poupons dont le poids est inférieur au 10^e percentile pour l'âge gestationnel sont constitutivement petits, mais présentent une croissance fœtale appropriée pour la taille et l'appartenance ethnique de leurs parents. De ce fait, cette condition s'apparente davantage à une grossesse normale [7].

La RCIU est divisée en deux catégories : symétrique ou asymétrique. La RCIU symétrique regroupe les fœtus possédant un faible taux de croissance réparti de façon égale au niveau de la tête, de l'abdomen et des os longs indiquant la survenue précoce d'une insulte intrinsèque (facteurs

génétiques, anomalies chromosomiques, infections virales ou autres) dérégulant la croissance fœtale, c'est-à-dire au moment où la croissance résulte principalement de la division cellulaire. À la naissance, ces enfants sont de faible poids et de longueur moindre et une récupération du poids lors de la poussée de croissance post-natale est rarement observée. La RCIU asymétrique réfère aux fœtus dont la tête et les os longs sont épargnés par rapport à l'abdomen et aux viscères ; le poids est donc faible, mais la longueur est conservée. Ce type de RCIU, principalement consécutive à des facteurs extrinsèques (disponibilité inadéquate de substrats et autres), survient au cours du dernier trimestre de la grossesse, au moment où la croissance fœtale découle d'une augmentation de la taille des cellules plutôt que de leur nombre. Une phase de récupération lors de la poussée de croissance post-natale est généralement observée chez ces enfants [142;222].

1.3.1.2 Les étiologies

La croissance fœtale dépend du potentiel de croissance prédéterminé génétiquement, mais également de sa modulation par des facteurs d'origine fœtale, maternelle, placentaire et externe. En fait, les facteurs génétiques (malformations congénitales, aberrations chromosomiques) sont responsables du tiers des variations du poids de naissance alors que les deux tiers restants sont déterminés par des facteurs environnementaux [142], regroupant des conditions maternelles (hypertension chronique, pré-éclampsie, diabète), extrinsèques (milieu socio-économique, malnutrition, consommation de cigarettes, de drogues et/ou d'alcool, infections) et placentaires (diminution de la perfusion utéro-placentaire, placentation anormale) [222;267]. Cependant, près de 40% des cas de RCIU sont d'étiologie inconnue [142]. Toutefois, la diminution, voire l'absence, de l'expansion volémique normalement associée à la grossesse documente une certaine proportion des cas idiopathiques de RCIU observés en clinique [83;226;229].

1.3.1.3 Les conséquences à court et long terme

Dans une grande majorité des cas, les enfants nés avec une RCIU connaissent une croissance normale au cours de l'enfance et de l'adolescence, même si près d'un tiers d'entre eux n'atteindront jamais une taille normale [204]. Les conséquences de la RCIU sont aussi nombreuses qu'il existe de causes à ce déficit de croissance, les complications étant différentes selon le moment au cours duquel se produit l'insulte [222]. Depuis maintenant une quinzaine d'années, des études tant chez l'homme que chez l'animal ont proposé l'idée que la RCIU soit associée à des conséquences à long terme sur le

développement cardiovasculaire, métabolique, endocrinien, reproducteur, neurologique, respiratoire et squelettique [22;94].

1.3.2 L'origine développementale des maladies de l'adulte

Des études menées par le professeur Barker au début des années 1990 ont mis en évidence le rôle de l'environnement fœtal dans le développement des maladies chroniques liées à l'âge adulte [19;20;22]. Depuis l'avènement de ces travaux, un nombre croissant d'études épidémiologiques, cliniques et expérimentales démontrant l'implication de l'environnement fœtal dans le développement de ces maladies sont venues étayer les observations du professeur Barker [73;80;122;178;199;284].

Dans sa formulation initiale, l'hypothèse de l'origine fœtale des maladies de l'adulte proposait que des facteurs environnementaux, particulièrement la nutrition, agissaient hâtivement au cours de la vie *in utero* et programmaient le risque d'un développement précoce des maladies cardiovasculaires et métaboliques lors de la vie *ex utero* [22]. Des études ayant démontré que la période néonatale et l'enfance sont sujettes à la programmation, on parle maintenant de l'origine développementale des maladies de l'adulte [21]. Ainsi, dans un contexte d'environnement périnatal où la nutrition serait sous-optimale, des mécanismes favorisant le développement et la croissance des organes ainsi que la maturation des systèmes biologiques seraient mis en place afin d'assurer une survie tant immédiate que future. Cependant, dans l'éventualité d'un environnement postnatal où les conditions nutritionnelles seraient supérieures à celles de la période périnatale, cette réponse adaptative de l'organisme deviendrait délétère et serait responsable du développement des maladies chroniques. Le concept sous-jacent à cette réponse adaptative est conforme à la définition de la programmation [166] qui fait intervenir la notion de périodes sensibles ou critiques lors du développement et de la croissance de l'organisme. Récemment, il a été proposé que le terme programmation soit remplacé par l'expression « plasticité développementale » qui définit l'habileté que possède un génotype unique de produire plusieurs phénotypes au niveau de la forme, de la structure et de l'état physiologique ou comportemental adopté par l'organisme en réponse aux conditions environnementales [21]. Ainsi, dans les limites imposées par son bagage génétique et les contraintes mécaniques, chaque individu possède toute une gamme d'options lui permettant de définir la forme et les fonctions ultimes adoptées par son organisme [181].

1.3.2.1 Un aperçu des modèles animaux

Étant donné la longévité de l'humain et l'influence de nombreux facteurs incontrôlables (hérédité, tabagisme, régime alimentaire et autres), le phénomène de l'origine développementale des maladies de l'adulte est difficile à étudier au sein de la population. Pour ces raisons, des efforts substantiels ont été fournis au cours des dernières années pour établir des modèles où les animaux développent des maladies chroniques subséquentes à un environnement fœtal défavorable. Dans la mesure où la physiopathologie de la RCIU et de ses conséquences est similaire aux conditions observées chez l'humain, l'étude et la compréhension des mécanismes gouvernant la croissance fœtale et le développement des maladies chroniques à l'aide de ces modèles animaux permettent assurément de faire progresser les connaissances scientifiques sur le sujet.

Il existe plusieurs approches expérimentales permettant d'induire un environnement fœtal défavorable et par conséquent, une RCIU. Les sites d'intervention peuvent être classifiés selon qu'ils soient maternels, placentaires ou fœtaux, avec des manipulations spécifiques à chacun de ces niveaux. Cette classification permet de diviser les expériences en deux grandes catégories, celles où la disponibilité des substrats est manipulée et celles où la croissance fœtale est directement perturbée [234]. La chaîne assurant l'apport adéquat en oxygène et en nutriments au fœtus peut être interrompue en de nombreux endroits. Il est entre autres possible d'altérer la disponibilité des substrats pour le fœtus par la manipulation de la nutrition maternelle, la création d'un environnement maternel hypoxique, l'induction d'une hypertension de grossesse, la réduction de la croissance/masse placentaire ou encore l'interférence au niveau de la circulation tant utéro-placentaire que fœto-placentaire. De plus en plus, l'approche consistant à influencer les mécanismes de contrôle de la croissance fœtale est favorisée pour mettre en évidence l'implication directe de certaines substances. Pour ce faire, plusieurs techniques sont employées, que l'on pense à l'infusion d'hormones ou de substrats dans la circulation fœtale, à la destruction ou même l'ablation des glandes sécrétant des hormones d'intérêt ou encore à la délétion/surexpression des gènes impliqués dans la régulation de la croissance fœtale.

Dans les pays industrialisés, la majorité des cas de RCIU sont attribuables à une dysfonction de la perfusion utéro-placentaire [30], donnant ainsi toute sa pertinence aux modèles animaux dans lesquels la RCIU est induite par une insuffisance placentaire consécutive à la ligature [273] ou l'occlusion

[117] de l'artère utérine, à la réduction de la masse placentaire [136] ou à une embolie de l'artère ombilicale [33]. Cependant, la diminution du flot sanguin maternel et/ou fœtal est souvent accompagnée d'un certain degré d'hyposie et d'une restriction de la disponibilité en substrats, rendant difficile l'isolation des facteurs susceptibles d'être impliqués dans la RCIU. De plus, le recours à la chirurgie rend lourd les protocoles d'utilisation de ces modèles animaux où des pertes fœtales sont parfois observées [12;234].

La manipulation de la nutrition maternelle est connue pour entraîner une programmation des différents systèmes de l'organisme en développement. En effet, au milieu des années 1960, Winick et collègues [276] avaient déjà démontré que la malnutrition au cours de la gestation chez le rat diminuait de façon irréversible le nombre de cellules dans certains tissus tels que le pancréas. Il existe plusieurs stratégies permettant d'interférer sur la croissance fœtale par la diète maternelle telles qu'une déficience en un nutriment spécifique comme le fer [69] et la sous-nutrition par une déficience calorique [278] ou protéique [158]. Les études utilisant ce type de modèle animal adhèrent généralement à un protocole où la quantité de protéines est réduite de 50% dans la diète maternelle, mais de nombreuses autres options existent. De plus, le moment choisi pour donner la diète ainsi que la durée du traitement varient considérablement au sein des différentes équipes travaillant sur le sujet. Bien que la plupart de ces travaux visent à simuler une RCIU et les conséquences qui en résultent, peu d'études parviennent à l'atteindre, entraînant une importante variation des phénotypes observés à l'âge adulte. La restriction calorique ou protéique mime les conditions auxquelles font face les nations des pays en développement et sous-développés [12;30], mais n'est pas représentative des diètes hypercaloriques caractéristiques des pays occidentaux. Dès lors, plusieurs laboratoires ont choisi d'investiguer les effets d'un régime riche en gras ou en cholestérol [109] pour comprendre les mécanismes potentiels sous-jacents au développement des maladies cardiovasculaires.

Par ailleurs, il a été observé que l'administration maternelle de glucocorticoïdes synthétiques au cours de la grossesse tant chez l'homme que chez l'animal était associée à une réduction du poids de naissance [221]. L'enzyme qui métabolise les glucocorticoïdes en produits inactifs au niveau placentaire, la 11 β hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β HSD2), a été proposée comme principale responsable de la surexposition du fœtus à ces hormones d'origine maternelle [84]. Cet excès de glucocorticoïdes entraîne non seulement une RCIU chez les fœtus, mais est également liée à une variété de phénotypes observables chez l'adulte, allant des maladies cardiovasculaires,

métaboliques ou endocriniennes aux modifications comportementales [236]. Ces données sont d'autant plus intéressantes que le traitement à l'aide de glucocorticoïdes synthétiques est recommandé par les Instituts Nationaux de la Santé (*National Institutes of Health* : NIH) pour toutes les femmes présentant un risque d'accouchement pré-terme, soit environ 12% de toutes les naissances américaines en 2005 [113], afin de réduire la morbidité néonatale et la fréquence des complications [1].

Dans tous les cas, les études à l'aide de modèles animaux ont démontré que la programmation des systèmes biologiques pouvait être initiée sans même que le poids de naissance soit affecté. Ceci signifie que la programmation des fonctions physiologiques post-natales peut se produire parmi toute la gamme normale de poids de naissance, mais est davantage présente aux extrémités où les pronostics sont généralement les plus mauvais [94].

1.3.2.2 Notre modèle : la restriction sodique

Notre laboratoire a créé un environnement fœtal défavorable en donnant une diète faible en sodium à des rates au cours du dernier tiers de gestation. Ce traitement est à l'origine de modifications au niveau de l'adaptation de l'organisme maternel à l'état gestationnel. Entre autres, il a été remarqué que l'expansion volémique [23] et l'augmentation du diamètre des vaisseaux utérins [251] qui accompagnent normalement la gestation sont réduites chez les femelles recevant la diète faible en sodium [228;252]. Puisque près du quart de l'accroissement du volume sanguin est dirigé vers la circulation utéro-placentaire [78], ces résultats semblent indiquer une diminution de la perfusion utéro-placentaire. La réduction du poids des placentas [228] appuie d'ailleurs cette hypothèse et suggère une altération du développement et de la croissance du placenta. Ceci est d'autant plus probable que la diète faible en sodium est donnée aux rates à G15, moment où l'invasion trophoblastique prend place chez le rat [45;269]. Des suites de cet environnement fœtal défavorable, les rats naissent petits (en poids et en longueur) par rapport aux rats témoins, révélant une RCIU [228]. Il a déjà été rapporté en clinique qu'une expansion volémique inadéquate au cours de la grossesse peut expliquer une portion des cas idiopathiques de RCIU [83;226;229]. Notre modèle animal représente donc un outil simple pour l'étude de la relation entre le volume plasmatique maternel et la croissance fœtale [228].

Une étude développementale conduite par Battista et collègues [26] montre que le cœur et le cerveau des fœtus RCIU sont de poids similaire à ceux des fœtus normaux alors que les reins sont de poids inférieur. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature suggérant que, lors d'un environnement intra-utérin défavorable, le flot sanguin destiné aux organes périphériques tel que le rein est redistribué vers des organes nobles comme le cerveau, le cœur et la surrénale [132], supportant l'idée d'une diminution de la perfusion utéro-placentaire dans notre modèle animal.

Différents paramètres ont été évalués chez les jeunes adultes de 12 semaines afin de vérifier la relation entre le poids de naissance et l'apparition de maladies chroniques tel que le suggère l'origine développementale des maladies de l'adulte. La pression artérielle systolique des animaux RCIU est plus élevée que celle des animaux témoins (~9 mmHg à 12 semaines) [26]. La régulation de la pression artérielle fait intervenir la participation de plusieurs organes et systèmes dont certains sécrètent des hormones qui influencent le débit cardiaque et la résistance vasculaire périphérique comme le SRA par la production d'AngII. Chez les animaux RCIU, il a été démontré que l'activité rénine plasmatique est augmentée [26]. La rénine étant l'enzyme limitante du SRA, il est possible que la concentration élevée d'AngII qui s'ensuit contribue à l'augmentation de la pression artérielle systolique chez ces animaux. Par ailleurs, en donnant un supplément sodique (0.9% de chlorure de sodium dans l'eau de breuvage) aux animaux RCIU pendant 6 semaines suivant la puberté, nous avons remarqué que l'inhibition du SRA chez les femelles RCIU était moindre par rapport aux femelles du groupe témoin, dénotant une réponse altérée au sel suite à un environnement fœtal défavorable (Bibeau et collègues, manuscrit en préparation).

Bien que les animaux RCIU présentent une pression artérielle plus élevée, on ne parle toutefois pas d'hypertension. Néanmoins, comme 35 à 50% des patients souffrant d'hypertension essentielle voient leur pression artérielle corrigée par une diète faible en sodium [41], l'hypertension semble être la conséquence d'un dérèglement des différents systèmes impliqués dans le contrôle de la pression artérielle et plus particulièrement, ceux intervenant dans l'équilibre du sodium comme la fonction rénale. Ainsi, des études concernant le rein ont été entreprises dans le laboratoire. À 12 semaines, les animaux RCIU présentent des concentrations plasmatiques augmentées d'urée et de créatinine, suggérant une diminution de la filtration glomérulaire. Toutefois, ni le nombre de glomérules ni la surface qu'ils occupent ne peuvent documenter cette altération [26]. En donnant un supplément sodique à ces animaux, nous avons démontré que l'hyperfiltration normalement associée à

l'augmentation de la consommation de sel ne semblait pas suffisante au maintien de l'homéostasie plasmatique chez les femelles, témoignant encore une fois d'une altération de la réponse au sel chez les animaux RCIU (Bibeau et collègues, manuscrit en préparation).

Chez les femelles RCIU âgées de 12 semaines, une hypertrophie ventriculaire gauche a été décelée par l'élévation du ratio poids du ventricule cardiaque gauche : poids total. Cette observation a été confirmée par une augmentation de l'expression du peptide natriurétique de l'oreillette (*atrial natriuretic peptide* : ANP). Les mesures histologiques ont toutefois échoué à démontrer une hypertrophie des cardiomyocytes [26]. Depuis, l'hypertrophie cardiaque observée chez ces femelles a été caractérisée aux niveaux génique, cellulaire et métabolique [25]. Ces travaux démontrent qu'un environnement fœtal défavorable réactive des gènes du programme fœtal d'expression génique, tels que l'ANP et la chaîne légère de la myosine de l'atrium (*atrial myosin light chain 1* : aMLC-1). Alors que l'ANP semble compensatoire à l'hypertrophie observée, l'aMLC-1 serait associée à l'augmentation de la longueur des sarcomères, unités contractiles des cellules cardiaques. Une augmentation de l'épaisseur des cardiomyocytes, modifiant à la hausse le volume cellulaire et confirmant l'hypertrophie au niveau cellulaire, est également remarquée. La diminution de l'expression de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ pourrait être impliquée dans le déficit de contractilité des cardiomyocytes présent dans notre modèle. Au point de vue métabolique, la diminution de l'activité de l'aconitase, une enzyme du cycle de Krebs, suggère une implication du stress oxydatif dans l'hypertrophie cardiaque.

Ainsi, toutes les études produites à l'aide de notre modèle animal de RCIU indiquent que les phénotypes observés chez les rats devenus adultes demeurent discrets. Ceci serait en partie dû au fait que 12 semaines dans la vie d'un rongeur correspondent à un jeune adulte d'une trentaine d'années chez l'humain [215] et que, par conséquent, la période que nous étudions coïncide davantage avec la mise en place des mécanismes conduisant à la maladie, plutôt qu'à celle où l'animal est réellement atteint. Néanmoins, nos travaux révèlent des différences au niveau de certains mécanismes de contrôle et de régulation. Dans tous les cas, il n'en demeure pas moins que l'augmentation de la pression artérielle, la dysfonction rénale, le remodelage cardiaque hypertrophique et la réponse altérée au sel constituent tous des facteurs de risque du développement des maladies cardiovasculaires. Ces résultats supportent donc la relation entre la RCIU et le développement subséquent de maladies associées au vieillissement, confirmant la pertinence de notre modèle pour l'étude de la programmation fœtale.

1.3.2.3 Les mécanismes sous-jacents de la plasticité développementale

La programmation intra-utérine peut se produire à tous les niveaux de l'organisme et impliquer des changements structuraux et fonctionnels des gènes, des cellules, des tissus et même, des organes complets. Ces modifications peuvent être isolées ou répandues avec des effets discrets ou cumulatifs sur le développement selon la nature et la synchronisation du stimulus initiant le phénomène de programmation [181].

Gènes. L'association entre la RCIU et le risque ultérieur de maladies chroniques serait due à un lien génétique direct entre la croissance fœtale et la susceptibilité à ces maladies héritée au moment de la conception. Il a en effet été proposé que certains des effets délétères à long terme observés suite à un environnement fœtal défavorable auraient leurs origines au niveau des gènes soumis à l'empreinte parentale [285]. Ces gènes sont exprimés de façon préférentielle selon qu'ils soient transmis par le père ou par la mère. Chez l'humain [185] et la souris [61], plusieurs des gènes soumis à l'empreinte jouent un rôle prépondérant dans la croissance placentaire et fœtale [218]. Parallèlement, des observations faites chez les jumeaux monozygotiques, à savoir le risque discordant de maladies chroniques quand les poids de naissance sont différents comparativement à un risque similaire lorsque les poids de naissance sont semblables, indiquent que deux phénotypes adultes divergents peuvent se développer à partir d'un génotype unique lorsque la croissance intra-utérine est compromise [209]. Des études récentes ont souligné le rôle des mécanismes épigénétiques, et plus particulièrement de la méthylation de l'ADN, comme cause potentielle de ces discordances. De façon intéressante, des travaux ont mis en évidence que, bien que les jumeaux monozygotes soient épigénétiquement indistinguables pendant les premières années de leur vie, ils acquièrent des différences remarquables à ce niveau avec l'âge [95]. Ces différences peuvent entre autres être expliquées par les effets de nature transitoire ou permanente [139] des facteurs environnementaux tels que les habitudes de vie, l'activité et les facteurs nutritionnels (nutriments, restriction calorique, stress et autres) sur les mécanismes régissant les phénomènes épigénétiques [130]. Cette modulation pourrait potentiellement déclencher le développement de certaines maladies [39] telles que le cancer [88]. Étant donné que la plasticité développementale confère à l'organisme en développement l'habileté de modifier de façon irréversible sa structure et ses fonctions en réponse à des changements de l'environnement dans lequel il évolue [21], il est de plus en plus accepté que l'épigénétique représente un des mécanismes moléculaires permettant de relier les gènes, l'environnement prénatal, la croissance intra-utérine et la susceptibilité aux maladies chroniques

[94]. Depuis, des études chez le rat en période néonatale ont démontré qu'une insuffisance utéro-placentaire est associée à une hypométhylation de l'ADN et à une hyperacétylation des histones dans différents tissus [35;96;146;170;208]. Alors que la restriction protéique au cours de la gestation entraîne des altérations de la méthylation de l'ADN et des anomalies cardiovasculaires chez les rats devenus adultes, l'ajout de nutriments dont le métabolisme génère des groupements méthyle comme la glycine [128] et le folate [165] à la diète maternelle permet de restaurer le patron normal de méthylation de l'ADN et de prévenir les dysfonctions observées chez les animaux adultes.

Cellules. Des changements de l'activité transcriptionnelle dus, par exemple, à une modulation épigénétique induite par des modifications de l'environnement peuvent mener à la perturbation de la synthèse et de l'abondance des protéines cellulaires (récepteurs, canaux, transporteurs, enzymes, facteurs de croissance ou hormones, protéines de structure ou de liaison, composantes des voies de signalisation intracellulaire et autres). Ces changements altèrent le métabolisme et la croissance des cellules et en modifient la sensibilité face à leur environnement. Les cellules étant particulièrement vulnérables lors de la formation des lignées et de leur différenciation subséquente, des conditions intra-utérines sous-optimales peuvent induire des changements au niveau du nombre, de la grosseur et de la fonction des cellules par la modulation de leur prolifération et du remodelage apoptotique qu'elles subissent [94]. Par exemple, l'équipe de Pham et collègues [208] a démontré qu'une insuffisance utéro-placentaire induite par la ligature des artères utérines et la RCIU qui en résulte sont associées à une hypométhylation de certaines régions du gène de p53, une protéine impliquée dans la régulation de l'apoptose, permettant ainsi une augmentation de son expression dans le rein fœtal. Cette altération affecte à son tour l'expression d'autres molécules-clés de l'apoptose et mène à une hausse de l'activité apoptotique qui pourrait contribuer à la diminution du nombre de néphrons observée chez ces animaux.

Tissus et organes. Les modifications de la structure et de la fonction des cellules peuvent à leur tour altérer la morphologie et la physiologie des tissus et même, des organes entiers. Dans le cas où l'insulte est produite au cours de l'organogenèse, les changements observés sont souvent sévères et peuvent conduire à un déficit développemental permanent. La composition cellulaire de certains tissus peut également être modifiée, perturbant alors la fonction physiologique du tissu en question. Les conditions intra-utérines défavorables provoquées par une insuffisance utéro-placentaire, par une surexposition aux glucocorticoides maternels ou par la manipulation de la nutrition maternelle sont

entre autres reliées à une réduction permanente de la population de néphrons [287] et de la masse de cellules pancréatiques sécrétrices d'insuline [223]. Ces déficits fonctionnels pourraient être à l'origine du développement des maladies chroniques, notamment de l'hypertension et du diabète de type 2, dans ces modèles de plasticité développementale.

Systemes. Les anomalies physiologiques qui découlent d'un environnement fœtal défavorable sont multifactorielles. Ainsi, la sévérité du phénotype est déterminée par l'étendue des organes et des systèmes affectés par la nature et la durée de l'insulte intra-utérine en relation avec le stade de développement fœtal au cours duquel elle survient [94]. Chez la brebis, l'administration maternelle de glucocorticoïdes synthétiques en début de gestation n'a pas d'effet sur la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez la progéniture devenue adulte, mais entraîne une hypertension. Par contre, le même traitement en fin de gestation est accompagné d'une augmentation de l'activité de cet axe ainsi que d'une intolérance au glucose chez l'animal devenu adulte [93;94]. Par ailleurs, certains phénotypes nécessitent un second stimulus pendant la vie extra-utérine pour devenir apparents. En effet, plusieurs études révèlent un dimorphisme sexuel quant à la programmation des fonctions et des systèmes biologiques et s'entendent sur le fait que les conséquences d'un environnement intra-utérin défavorable deviennent plus évidentes avec le vieillissement, au fur et à mesure que les adaptations compensatoires des autres tissus et systèmes deviennent inefficaces [181].

2. LA SURRÉNALE

La surrénale est composée de deux régions dont les caractéristiques structurales et fonctionnelles sont distinctes : le cortex situé en périphérie qui se développe à partir du mésoderme et la portion centrale, la médulla, qui dérive de l'ectoderme. Le cortex produit des hormones stéroïdiennes qui sont essentielles à la vie, leur absence entraînant la mort par déshydratation et déséquilibre électrolytique alors que la médullosurrénale libère des catécholamines impliquées dans la réponse au stress. Afin de maintenir une homéostasie systémique, la sécrétion de ces hormones nécessite l'intervention de différents mécanismes de régulation.

2.1 LES ZONES FONCTIONNELLES DE LA SURRÉNALE ADULTE

Le cortex surrénalien est fonctionnellement défini par la présence de trois zones cellulaires distinctes qui se caractérisent par l'expression spécifique d'enzymes de la stéroïdogénèse et par l'habileté à répondre à un stimulus en particulier (Tableau 1) [14;143;148;203].

Tableau 1. Les zones fonctionnelles de la corticosurrénale mature chez l'humain.
Adaptée de [148].

	Zona glomerulosa	Zona fasciculata	Zona reticularis
Localisation	Externe	Centrale	Interne
Stimulus	Ang, K ⁺ et ACTH	ACTH	ACTH
Récepteur membranaire	AT	MC2R	MC2R
Enzyme	CYP11B2	CYP17/CYP11B1	CYP17
Sécrétion	Minéralocorticoïdes (aldostérone)	Glucocorticoïdes (cortisol)	Androgènes (DHEA)
Fonction	Équilibre électrolytique	Métabolisme du glucose/ Mobilisation des réserves énergétiques	Incertaine

La portion externe du cortex est la zona glomerulosa (ZG). L'expression exclusive du CYP aldostérone synthase (CYP11B2) lui permet de sécréter des minéralocorticoïdes (aldostérone) qui sont responsables du maintien de l'équilibre hydro-électrolytique. La régulation de la sécrétion des minéralocorticoïdes passe par le SRA et son effecteur, l'Ang, par la concentration plasmatique de potassium et dans une moindre mesure, par la corticotrophine (*adrenocorticotropic hormone*: ACTH). L'Ang stimule la production d'aldostérone par son récepteur (*angiotensin II receptor*: AT) de type 1 à la surface des cellules glomérulées tandis que le potassium en induit la dépolarisation [63]. La zona fasciculata (ZF) est la portion centrale du cortex. Elle synthétise des glucocorticoïdes (cortisol) sous l'action des CYP 17 α -hydroxylase/17,20 lyase (CYP17) et 11 β -hydroxylase (CYP11B1). Les glucocorticoïdes interviennent dans le métabolisme du glucose et la mobilisation des réserves énergétiques, particulièrement en situation de stress. L'ACTH libérée par l'adénohypophyse régule leur production par le récepteur de la mélanotrophine de type 2 (*melanocortin 2 receptor*: MC2R). La portion interne du cortex, la zona reticularis (ZR), sécrète des stéroïdes à action androgène (déhydroépiandrostérone [DHEA], DHEA-sulfate, androstènedione) sous l'action du CYP17. Les

androgènes d'origine surrénalienne servent de précurseurs à la conversion périphérique pour la production d'hormones androgéniques actives (testostérone, dihydrotestostérone). La production d'androgènes est sous la dépendance de l'ACTH et de son récepteur, le MC2R.

La médullosurrénale qui occupe la portion centrale de la surrénale est responsable de la synthèse des catécholamines. Alors que la norépinéphrine est le principal neurotransmetteur de la branche sympathique du système nerveux autonome, la médullosurrénale sécrète principalement de l'épinéphrine grâce à la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT) qui convertit la norépinéphrine en épinéphrine. La fonction des catécholamines d'origine surrénalienne est d'amplifier les effets du système nerveux sympathique, la médullosurrénale étant innervée par des branches de ce système [90;143].

2.2 LES FONCTIONS ENDOCRINES DE LA SURRÉNALE

Les hormones de la corticosurrénale sont des stéroïdes dérivés du cholestérol et sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique lisse et la mitochondrie. Les enzymes intervenant dans leur biosynthèse sont responsables des modifications de la structure du noyau de cholestérol. Ces hormones liposolubles diffusent à travers les bicouches lipidiques et se fixent à leur récepteur à l'intérieur de la cellule cible. Les catécholamines produites par la médullosurrénale dérivent de la décarboxylation et de la modification de la tyrosine. Le récepteur de ces hormones est une protéine membranaire faisant face au milieu extracellulaire et la liaison des catécholamines entraîne la libération d'un second messager dans le milieu intracellulaire pour initier la réponse hormonale.

2.2.1 La stéroïdogénèse surrénalienne

Chez les mammifères, la biosynthèse des hormones stéroïdiennes s'amorce avec le cholestérol comme précurseur commun. Un apport constant en cholestérol doit être disponible dans les cellules afin d'initier et de maintenir la stéroïdogénèse [253]. Le cholestérol nécessaire provient de trois sources potentielles (Figure 11); il peut être (1) synthétisé *de novo* par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase du réticulum endoplasmique à partir de l'acétyl CoA; (2) tiré de la circulation sanguine par la captation des lipoprotéines de faible (*low-density lipoprotein* : LDL) et de haute (*high-density lipoprotein* : HDL) densité qui sont riches en cholestérol libre et estérifié ou (3) mobilisé à partir des réserves intracellulaires de cholestérol estérifié. Ces réserves dérivent de la

captation des lipoprotéines plasmatiques et de la synthèse endogène de cholestérol [18]. Pour être emmagasiné sous forme de gouttelettes lipidiques, le cholestérol libre doit être estérifié par l'acyl-CoA cholestérol acyl transférase (ACAT) [152]. Bien que nécessaire à la réponse surrénalienne aiguë, la mobilisation des réserves d'esters de cholestérol n'est pas suffisante pour soutenir la production maximale d'hormones stéroïdiennes suite à une stimulation prolongée. Ainsi, les cellules de la corticosurrénale se reposent sur la captation des lipoprotéines plasmatiques pour assouvir leurs besoins en cholestérol [271]. Le cholestérol dérivé des lipoprotéines est obtenu par l'endocytose des LDL par le récepteur des LDL [40] ou par la captation sélective des HDL par le récepteur d'épuration classe B type I (*scavenger receptor class B type I* : SR-BI) [18]. Chez les rongeurs, il apparaît que cette voie sélective délivre quantitativement plus de cholestérol que la voie d'endocytose suite à une stimulation de la surrénale [153;275].

Lors d'une stimulation de la surrénale, les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre avant d'être acheminés vers la mitochondrie où se déroule la première étape de la stéroïdogenèse. Cette réaction se produit sous l'action d'une cholestérol ester hydrolase neutre (*neutral cholesterol ester hydrolase* : nCEH) dont l'activité relève principalement de la lipase hormono-sensible (*hormone sensitive lipase* : HSL) [152]. Des travaux récents ont permis l'identification d'un groupe de quinze protéines, les StarD, contenant chacune un domaine START (*steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer*) responsable de leur liaison aux lipides [248]. Ces protéines sont impliquées dans le contrôle de plusieurs aspects de la biologie des lipides tels que le trafic intracellulaire du cholestérol ainsi que son métabolisme [8]. Certaines des protéines StarD ne possédant pas de séquences les ciblant à une localisation spécifique au niveau subcellulaire, elles apparaissent comme des protéines cytoplasmiques qui transportent les lipides dans le cytosol [184]. Ainsi, il a été proposé que la sous-famille de protéines StarD4 – StarD4, StarD5 et StarD6 – serait responsable de la livraison du cholestérol en provenance de diverses localisations cellulaires (gouttelettes lipidiques, réticulum endoplasmique) vers la membrane externe de la mitochondrie [8]. Une fois présent à cette membrane, le cholestérol est transféré par la protéine de transport StarD1 (ou StAR) [8;254] à l'intérieur de la mitochondrie où siège le CYP11A (*cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage*), première étape enzymatique de la stéroïdogenèse. Dans la surrénale, ce processus est finement régulé et est considéré comme limitant dans la mesure où l'absence ou la mutation du gène codant pour la StAR entraîne un déficit total de la synthèse des hormones stéroïdiennes, l'hyperplasie congénitale lipoïde des surrénales [55]. La StAR serait appuyée dans sa fonction par la protéine de translocation mitochondriale (*mitochondrial translocator*

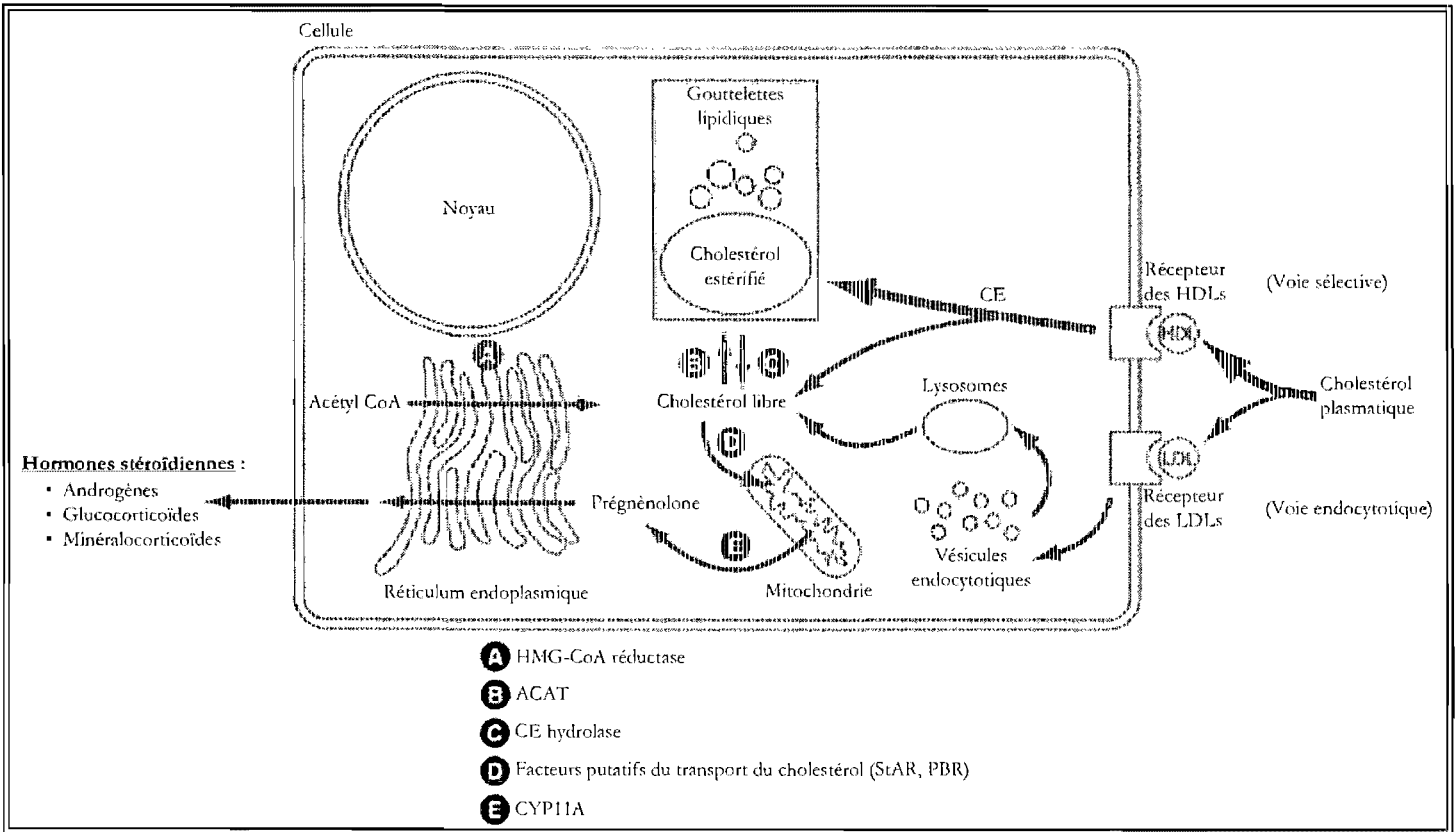


Figure 11. Les principales sources de cholestérol et les enzymes-clés responsables de son métabolisme dans la stéroïdogénèse surrénalienne. Adaptée de [18].

protein : mitoTSPO), aussi nommée PBR (*peripheral-type benzodiazepine receptor*), faisant elle-même partie d'un vaste complexe multimérique [201].

Les enzymes de la stéroïdogénèse sont classées en deux catégories de protéines (Tableau 2) : les CYP et les hydroxystéroïdes déshydrogénases (*hydroxysteroid dehydrogenase* : HSD) [203]. Les CYP sont des protéines associées à la membrane des mitochondries (CYP11A, CYP11B1, CYP11B2) ou du réticulum endoplasmique (CYP17, CYP 21-hydroxylase [CYP21]) qui catalysent l'hydroxylation et le clivage des substrats stéroïdiens par l'utilisation d'oxygène et le transfert d'une paire d'électrons provenant du NADPH. Dans le cas des CYP mitochondriaux, le transport des électrons implique la participation de l'adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine. Le transfert des électrons au niveau du réticulum n'implique que le CYP oxydoréductase. La classe des HSD, incluant les 3 β HSD et les 17 β HSD, ne compte qu'un membre actif dans le cas de la stéroïdogénèse surrénalienne, la 3 β HSD/isomérase de type II (3 β HSDII) qui est liée à la membrane des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Les HSD sont impliquées dans l'oxydo-réduction des hormones stéroïdiennes, réaction qui requiert la participation du NADPH.

Tableau 2. Les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse surrénalienne chez l'humain.
Adaptée de [203].

Gène	Protéine (poids moléculaire)	Nom	Localisation cellulaire	Expression
<i>CYP11A1</i>	CYP11A (56kDa)	P450 <i>cholesterol side-chain cleavage</i> (P450scc)	mitochondrie	ZG, ZF et ZR
<i>CYP11B1</i>	CYP11B1 (50kDa)	P450 11 β -hydroxylase (P45011 β)	mitochondrie	ZF et ZR
<i>CYP11B2</i>	CYP11B2 (48.5kDa)	P450 aldostérone synthase (P450aldo)	mitochondrie	ZG
<i>CYP17</i>	CYP17 (57kDa)	17 α -hydroxylase/ 17,20 lyase (P450c17)	réticulum	ZF et ZR
<i>CYP21B</i>	CYP21 (56kDa)	21-hydroxylase (P450c21)	réticulum	ZG, ZF et ZR
<i>HSD3B2</i>	3 β HSDII (42kDa)	3 β hydroxystéroïde déshydrogénase/ isomérase type II (3 β HSDII)	mitochondrie réticulum	ZG, ZF et ZR

La première étape enzymatique de la biosynthèse de tous les stéroïdes est catalysée par le CYP11A qui assure le clivage de la chaîne latérale du cholestérol (Figure 12). Cette réaction produit la prégnénolone, une molécule à 21 atomes de carbone (C). L'expression du CYP11A est détectable dans les trois zones du cortex surrénalien. La prégnénolone est ensuite métabolisée par deux enzymes complémentaires, le CYP17 et la 3 β HSDII. Le CYP17 est responsable de la 17 α -hydroxylation des stéroïdes à 21C desquels il clive le lien C17-20 pour produire des stéroïdes à 19C. Détectée dans tous les tissus stéroïdogéniques, l'expression du CYP17 diffère selon l'espèce. Par exemple, chez le rat et la souris, son expression est indétectable dans la surrénale, rendant la synthèse de cortisol impossible. Ainsi, ces animaux produisent de la corticostérone, un stéroïde intermédiaire de la synthèse de l'aldostérone. Parallèlement au CYP17, la 3 β HSDII convertit les Δ^5 -3 β -hydroxystéroïdes en Δ^4 -3 β -kétostéroïdes. Chez le rat, la 3 β HSDII est présente dans toutes les zones de la corticosurrénale.

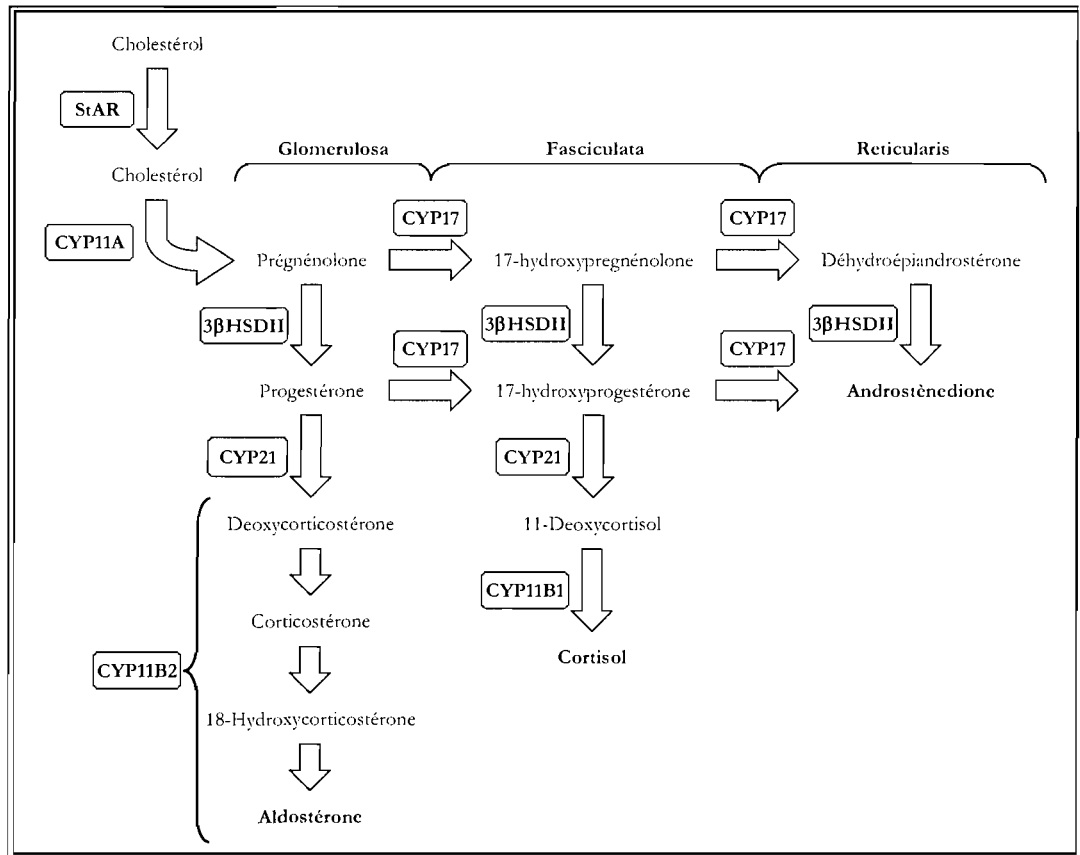


Figure 12. La stéroïdogénèse surrénalienne chez l'humain.

Adaptée de [148;203].

Le CYP21 catalyse l'hydroxylation en C21 de la progestérone et de la 17 α -hydroxyprogestérone pour former la 11-désoxycorticostérone et le 11-désoxycortisol. Dans le cas des rongeurs, seule la progestérone sert de substrat au CYP21 en raison de l'absence du CYP17. Cette hydroxylation représente l'étape catalytique déterminante de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes spécifiques de la surrénale, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes.

La synthèse des minéralocorticoïdes est limitée à la ZG en raison de la présence exclusive du CYP11B2. Cette enzyme catalyse la formation de l'aldostérone à partir de la 11-désoxycorticostérone. L'expression du CYP11B1 s'étend aux ZF/ZR où a lieu la production de glucocorticoïdes. Bien qu'elle possède la capacité d'hydroxyler le C18 de la 11-désoxycorticostérone ou de la corticostérone pour former la 18-hydroxycorticostérone, cette enzyme ne peut catalyser l'oxydation du groupement C18-hydroxyl nécessaire à la formation de l'aldostérone. Pour ces raisons, le CYP11B1 assure la synthèse spécifique des glucocorticoïdes.

2.2.2 Les fonctions des hormones de la corticosurrénale

Les récepteurs des hormones stéroïdiennes font partie de la famille des récepteurs nucléaires. En absence d'aldostérone et de cortisol, le récepteur des minéralocorticoïdes (*mineralocorticoid receptor* : MR) et des glucocorticoïdes (*glucocorticoid receptor* : GR) est localisé dans le cytosol, chacun formant un complexe hétéro-oligomérique avec entre autres des protéines thermolabiles (*heat shock protein* : hsp). L'activation du récepteur par la liaison de l'hormone entraîne des changements conformationnels de la structure du récepteur, menant à sa dissociation des hsp et à l'exposition des sites de localisation nucléaire. Le complexe hormone-récepteur est alors pris en charge par des protéines de translocation qui assurent son transport au noyau où il s'homodimérise et interagit avec une séquence spécifique d'ADN, l'élément de réponse aux stéroïdes, située au niveau de gènes cibles. Le complexe actif hormone-récepteur agit comme facteur de transcription et active/réprime l'expression de ces gènes. Il peut également intervenir à titre de modulateur de l'activité transcriptionnelle et ce, sans liaison directe à l'ADN, par son interaction avec d'autres facteurs de transcription [63;182;289].

2.2.2.1 Les minéralocorticoïdes

À l'origine, il était pensé que la spécificité de la réponse à l'aldostérone était fournie par la présence ou l'absence du MR au sein des tissus. Ainsi, la distribution restreinte du MR aux tissus épithéliaux

(rein, côlon) et vasculaires limitait le champ d'action de l'aldostérone alors que l'expression ubiquitaire du GR assurait un effet systémique au cortisol. Des études ultérieures ont toutefois démontré que le MR lie l'aldostérone et les glucocorticoïdes avec une affinité comparable et initie une réponse intracellulaire. Ce manque de spécificité du MR pour son ligand associé au fait que les concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes sont une centaine de fois supérieures à celles de l'aldostérone suggéraient une occupation prédominante du MR par les glucocorticoïdes et donc, l'existence d'un mécanisme alternatif assurant la réponse spécifique aux minéralocorticoïdes [63].

Une partie de l'explication est venue avec la découverte d'une protéine dont l'expression colocalisait avec celle du MR dans les tissus épithéliaux et vasculaires, la 11 β HSD2 [100]. Cette enzyme qui catalyse la conversion des glucocorticoïdes actifs en métabolites inactifs ayant peu d'affinité pour le MR protège le récepteur de la liaison inopportune des glucocorticoïdes. Néanmoins, ce mécanisme ne peut à lui seul enrayer complètement l'activation du MR par les glucocorticoïdes et n'explique pas la spécificité de la réponse à l'aldostérone dans les tissus où l'expression de 11 β HSD2 est faible, voire absente. Depuis, d'autres mécanismes au maintien de la spécificité de la réponse minéralocorticoïde ont été proposés tels que l'importance de la stabilité de l'interaction entre le ligand et son récepteur par rapport aux propriétés de transactivation du complexe [87] et la dépendance envers le statut rédox de la cellule [98].

Le mécanisme classique d'action de l'aldostérone a été mis en évidence dans les cellules épithéliales du néphron. La stimulation des cellules principales, localisées dans les tubules distal, connecteur et collecteur du néphron, initie une réponse en deux phases : une phase précoce dont les effets sont observables dans les quatre à six heures suivant la stimulation et une phase tardive [63;180]. La protéine kinase 1 induite par le sérum et par les glucocorticoïdes (*serum- and glucocorticoid-induced kinase 1* : SGK1) représente le médiateur-clé de la réponse à l'aldostérone [63;180;266]. Une fois activée, la SGK1 régule une variété de transporteurs ioniques tels que le canal sodique épithélial (*epithelial sodium channel* : ENaC) et le canal potassique de la médulla externe du rein (*renal outer medullary potassium channel* : ROMK) qui se situent à la membrane apicale des cellules principales ainsi que la pompe Na⁺/K⁺/ATPase, trouvée à la membrane basolatérale. Ainsi, suite cette réabsorption de sodium, un plus grand volume d'eau est retourné vers le liquide extracellulaire et le sang. L'excrétion de potassium par le ROMK et de protons est également favorisée en raison de l'augmentation de la différence de potentiel électrique entre les cellules et la lumière du tubule [81;143;266].

Le MR est également localisé dans des tissus non-épithéliaux, notamment dans les systèmes cardiovasculaire et nerveux central. Toutefois, malgré des propriétés similaires au MR classique, sa liaison à l'aldostérone dans le cœur, les vaisseaux sanguins ou le cerveau est associée à des conséquences variées. Dans le système cardiovasculaire, l'aldostérone promeut l'hypertrophie cardiaque, induit une fibrose et altère la fonction vasculaire endothéliale alors qu'elle intervient dans la régulation de la pression artérielle, de l'appétit pour le salé et du tonus sympathique au niveau du système nerveux central. Par ailleurs, il apparaît que les effets de l'aldostérone dans ces tissus sont rapides, dans les 15 minutes suivant une stimulation, par rapport aux actions génomiques connues du MR, indiquant que le MR peut médier des effets non génomiques, mais suggérant aussi l'existence d'un récepteur membranaire [63;99].

2.2.2.2 Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes régulent plusieurs processus biologiques essentiels comme la croissance, le développement, le métabolisme et le comportement [14;143]. Au cours de la croissance et du développement du fœtus, ils sont importants pour la maturation de certains organes et systèmes biologiques, entre autres, des poumons et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. De façon générale, dans l'organisme mature, les glucocorticoïdes inhibent la synthèse des protéines et accélèrent leur catabolisme, à l'exception du foie où ils stimulent la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Bien que ces actions fournissent les substrats nécessaires au métabolisme intermédiaire, elles sont responsables des effets délétères sur le muscle squelettique, les os et les tissus conjonctifs et lymphatiques. Ainsi, les glucocorticoïdes contribuent au maintien du taux plasmatique de glucose par l'augmentation de la gluconéogenèse hépatique, de la déposition de glycogène et de la relâche de substrats au niveau périphérique par différents mécanismes. Dans le muscle, il y a une diminution de la synthèse des protéines et de l'utilisation/entrée du glucose accompagnée d'une augmentation de la dégradation des protéines afin de contribuer à la relâche d'acides aminés dans le sang et il y a stimulation de la lipolyse dans le tissu adipeux afin de permettre la mobilisation des acides gras et du glycérol. Les glucocorticoïdes agissent également sur d'autres tissus et systèmes. Par exemple, ils favorisent la sécrétion d'épinéphrine par la médullosurrénale, ils augmentent la contractilité cardiaque et la réponse des vaisseaux sanguins aux agents vasoconstricteurs pour maintenir la fonction cardiovasculaire et ils sont responsables de la suppression des réactions immunitaires/ inflammatoires par, entre autres, l'inhibition de la synthèse des molécules pro-inflammatoires (cytokines) [14].

La plupart de ces actions, voire toutes, sont assurées par le GR dont la distribution est ubiquitaire. Les mécanismes de la façon dont une hormone par l'intermédiaire de son récepteur module une telle diversité de fonctions sont en grande partie inconnus. Cependant, des études suggèrent que cette variété de réponses soit le résultat de multiples isoformes du GR, le fruit d'un épissage alternatif de l'ARN et du déclenchement alternatif de la traduction de l'ARNm. De plus, les différents isoformes du GR seraient sujets à des modifications post-traductionnelles qui moduleraient la stabilité et la fonction du GR. Ainsi, il est spéculé que la composition et la proportion de chacun des isoformes du GR exprimés dans un type cellulaire donné soient responsables de la diversité de réponses dues aux glucocorticoïdes, de manière à établir une règle selon laquelle la régulation de l'expression génique de type cellule-spécifique est assurée par un facteur de transcription unique [289].

2.2.3 La synthèse des catécholamines

La voie de synthèse des catécholamines (Figure 13) s'amorce par l'hydroxylation de la tyrosine captée dans le milieu extracellulaire par un système de transport actif. La tyrosine dérive de l'ingestion de nourriture ou d'une synthèse hépatique à partir de la phénylalanine et est transportée activement dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale où elle est convertie en dihydroxyphénylalanine (DOPA) par la tyrosine-hydroxylase (TH) qui constitue l'étape limitante de la biosynthèse des catécholamines. La DOPA est décarboxylée en dopamine par une décarboxylase spécifique des acides aminés aromatiques. La dopamine entre dans les granules de sécrétion pour être hydroxylée en norépinéphrine sous l'action de la dopamine β hydroxylase (D β H). Emmagasinée dans ces granules, la norépinéphrine peut être sécrétée par exocytose lors d'une stimulation nerveuse sympathique. Toutefois, une bonne partie de la norépinéphrine diffuse hors des granules vers le cytoplasme où elle est convertie en épinéphrine par la PNMT [90].

2.2.4 Les fonctions des hormones de la médullosurrénale

Les récepteurs adrénergiques sont des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptor* : GPCR). Suite à la fixation de l'hormone, le récepteur adopte une conformation lui permettant d'interagir avec un hétérotrimère spécifique de protéines G. L'interaction provoque la liaison de la guanosine triphosphate (GTP) à la sous-unité α , sa dissociation des sous-unités $\beta\gamma$ et sa liaison à un effecteur spécifique induisant la relâche de seconds messagers et la

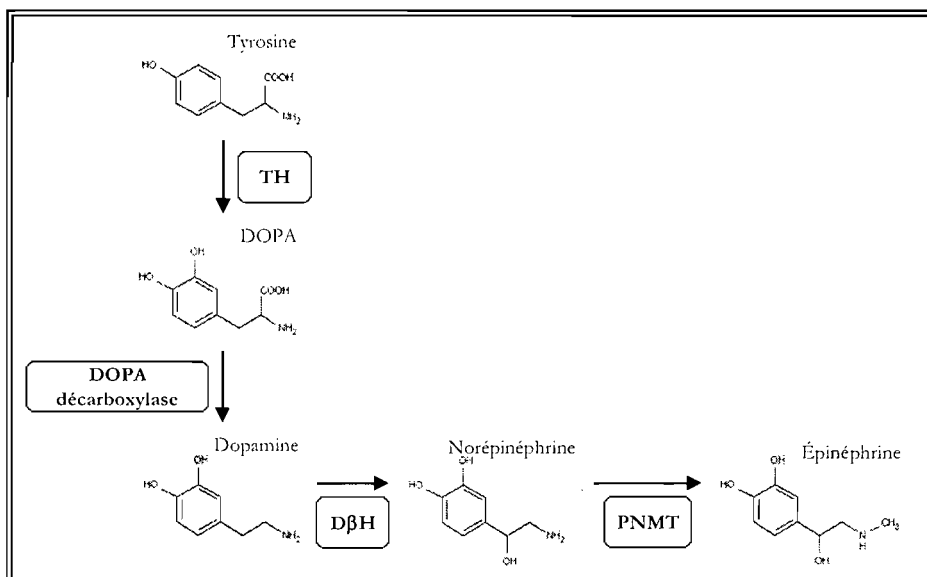


Figure 13. La biosynthèse des catécholamines.

Adaptée de [283].

réponse cellulaire [182]. Les récepteurs α - et β -adrénergiques sont largement distribués au niveau systémique. Ils se subdivisent en sous-classes (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3) selon les effets qu'ils produisent et les substances qui les activent/inhibent. Alors que le récepteur α_1 -adrénergique fait appel à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et au diacylglycérol (DAG) comme seconds messagers, les autres sous-types de récepteurs assurent leur réponse intracellulaire par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). À quelques exceptions près, l'activation des récepteurs α_1 - et β_1 -adrénergiques engendre l'excitation tandis que les récepteurs α_2 - et β_2 -adrénergiques provoquent une inhibition. Ainsi, la spécificité de réponses est fournie par le motif d'expression des récepteurs adrénergiques sur les organes et les tissus cibles [90;143].

2.3 LA RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION HORMONALE

La régulation de la sécrétion hormonale est régie par des signaux du système nerveux, des fluctuations des composantes chimiques du sang et d'autres hormones. Dans le cas de la surrénale, ce sont des influx nerveux du système nerveux autonome sympathique qui régulent la production de catécholamines alors que la libération des corticostéroïdes fait intervenir différents mécanismes de contrôle tels que la concentration sanguine de potassium pour la sécrétion des minéralocorticoïdes et l'ACTH générée par l'adénohypophyse pour la production de glucocorticoïdes [14].

2.3.1 Le cortex surrénalien

De nombreux facteurs sont connus pour influencer la synthèse de l'aldostérone, incluant les catécholamines [36], la sérotonine [161], la vasopressine (VP) [102], l'endothéline [217], le tissu adipeux [155], la dopamine [212] et l'ANP [196]. Néanmoins, les principaux régulateurs de cette sécrétion demeurent l'AII produite par l'activité du SRA, la concentration extracellulaire de potassium et l'ACTH [63]. La synthèse et la sécrétion de glucocorticoïdes est quant à elle régulée par un mécanisme de rétro-inhibition classique auquel participent l'hypothalamus par la libération de corticolibérine (*corticotrophin releasing hormone* : CRH) et de VP et l'hypophyse par la sécrétion d'ACTH [3;272].

2.3.1.1 La zona glomerulosa : l'angiotensine II, le potassium et la corticotrophine

Il est possible de diviser la régulation de la biosynthèse de l'aldostérone en deux phases. Dans les minutes ou les heures suivant une stimulation (réponse aiguë), la sécrétion d'aldostérone est sous le contrôle des niveaux cellulaires de la StAR. Dans le cas d'une stimulation chronique (des heures à des jours), la production d'aldostérone devient plutôt dépendante de l'expression du CYP11B2 [24].

Le système rénine-angiotensine. La biosynthèse de l'aldostérone dans la ZG est principalement le fait de l'activité du SRA. La rénine est synthétisée par les cellules juxtaglomérulaires du rein en réponse à des changements de la composition sanguine, à une stimulation du système nerveux sympathique ou à l'activation des barorécepteurs rénaux. Elle est libérée dans la circulation sanguine où elle rencontre son substrat, l'angiotensinogène (AGT) qu'elle transforme en angiotensine I (AI). Cette caractéristique fait de la rénine l'enzyme limitante du SRA [46;207]. L'AI est rapidement convertie en AII par son clivage par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*angiotensin converting enzyme* : ACE) présente, entre autres, dans les poumons et le tissu vasculaire [46;206]. L'AII, le peptide actif le plus important du SRA, est un stimulus efficace de la sécrétion d'aldostérone par la ZG et un agent vasoconstricteur puissant.

Les actions de l'AII sont assurées par les récepteurs AT₁ et AT₂, des GPCR qui stimulent un éventail de voies de signalisation intracellulaire responsables de la diversité de réponses à l'AII [74;79]. Chez l'humain, le récepteur AT₁ est largement distribué au sein de l'organisme adulte, se retrouvant

principalement dans les vaisseaux, le cœur, le rein, la surrénale et le cerveau. Deux isoformes du récepteur AT_1 ont été caractérisés chez le rongeur, le récepteur AT_{1A} qui est présent dans la majorité des tissus et le récepteur AT_{1B} dont l'expression est limitée à la surrénale et l'hypophyse. Bien que ubiquitaire dans les tissus fœtaux, le récepteur AT_2 n'est présent chez l'adulte que dans le cerveau, les vaisseaux, le cœur, la surrénale, le rein et les tissus reproducteurs [46;206]. Virtuellement, tous les rôles proposés de l'AII sont associés à sa liaison avec le récepteur AT_1 , le rôle fonctionnel du récepteur AT_2 n'étant que partiellement élucidé [79]. Toutefois, le récepteur AT_2 peut se lier directement au récepteur AT_1 pour former un hétérodimère, bloquant les voies de signalisation et les fonctions du récepteur AT_1 par la stabilisation de sa structure, prévenant ainsi les changements conformationnels assurant l'activation des protéines G [2].

La biosynthèse de l'aldostérone par la ZG induite par l'AII est assurée par son récepteur AT_1 par l'activation de la phospholipase C (PLC), résultant en une augmentation de la production intracellulaire d' IP_3 et de DAG [24;63]. Cette voie mène à une mobilisation des pools intracellulaires de calcium ainsi qu'à la phosphorylation de facteurs de transcription. L'augmentation des niveaux intracellulaires de calcium est assurée par l' IP_3 par la stimulation de la relâche de calcium par les réserves intracellulaires et l'ouverture de canaux calciques à la membrane, favorisant un influx de calcium extracellulaire [59]. Par ailleurs, l' IP_3 active la voie de la calmoduline (CaM) et des protéines kinases calcium/CaM-dépendante (*calcium/calmodulin-dependant protein kinase*: CCaMK) alors que le DAG stimule la protéine kinase C (PKC). Par phosphorylation, les protéines kinases activent à leur tour des facteurs de transcription qui initient la transcription de gènes cibles tels que la *SzAR* [60] et le *CYP11B2* [63].

Certains tissus possèdent toute la machinerie nécessaire à la production d'AII et à sa réponse, incluant la surrénale, les vaisseaux, le cœur, les reins et le placenta. Chacun de ces SRA locaux participerait à une fonction particulière au sein du tissu où il se trouve, la production locale d'AII ayant le potentiel de médier des actions autocrines et/ou paracrines [46;160].

Le potassium. Les cellules de la ZG sont extrêmement sensibles à d'infimes variations de la concentration extracellulaire de potassium, faisant de ce paramètre un déterminant-clé de la sécrétion d'aldostérone [249]. Cette caractéristique est due à la présence de canaux potassiques à deux domaines, les canaux TASK (*tandem of P domains in a weak inwardly rectifying potassium channel* (TWIK)-

related acid-sensitive potassium channel), qui génèrent des conductances de fond, contrôlent le potentiel de repos des cellules et contribuent à la perméabilité de repos élevée face au potassium [70;110]. Ainsi, l'augmentation de la concentration extracellulaire de potassium stimule la sécrétion d'aldostérone par une dépolarisation de la cellule menant à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant de type L et T et à l'élévation rapide de la concentration intracellulaire de calcium. Cette hausse de calcium intracellulaire active la CaM et les CCaMK qui phosphorylent des facteurs de transcription afin de promouvoir la transcription du gène de la *SzAR* [60] et du *CYP11B2* [63].

La corticotrophine. Il a été démontré que les souris privées du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC), le précurseur immature de l'ACTH, présentent une morphologie anormale de la corticosurrénale et une diminution marquée, mais détectable, des niveaux d'aldostérone, révélant l'importance de l'ACTH pour la sécrétion d'aldostérone [62]. Toutefois, bien que la stimulation aiguë des cellules de la ZG par l'ACTH induise la production d'aldostérone, un excès chronique d'ACTH en supprime les concentrations circulantes [63]. Les mécanismes sous-jacents à cette réponse demeurent obscurs, mais impliqueraient les concentrations intracellulaires d'AMPc générées par l'activation du MC2R [24;63], présent dans toutes les zones de la corticosurrénale [281].

2.3.1.2 Les zona fasciculata et reticularis : la corticotrophine et la vasopressine

La régulation de la synthèse des glucocorticoïdes par les cellules de la ZF et des androgènes par les cellules de la ZR est sous la régulation des hormones dérivées de l'axe hypothalamo-hypophysaire [14], même si d'autres facteurs tels que les neurotransmetteurs [133], les cytokines [129] et certains (neuro)peptides [198] peuvent y jouer un rôle.

La fonction hypothalamique est régulée par des signaux d'origine hormonale qui reposent sur le phénomène de rétro-inhibition ainsi que sur les influx neuronaux [13]. De cette manière, la relâche de CRH et de VP par le noyau paraventriculaire (*paraventricular nucleus* : PVN) de l'hypothalamus dans le système porte hypothalamo-hypophysaire est stimulée par des influx en provenance des systèmes nerveux central et périphérique en réponse, le plus souvent, à une situation de stress physique ou psychologique [235;272], mais inhibée par de fortes concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes par le GR présent à ce niveau [129;272]. En fait, la VP serait impliquée dans la sensibilisation de l'adénohypophyse à de nouveaux stimuli ainsi que dans le maintien de la réponse corticotrope au cours d'un stress chronique par, entre autres, la potentialisation des effets stimulants de la CRH sur la

sécrétion d'ACTH, la VP seule étant un faible stimulus de l'activité corticotrope [4;272]. Dans l'adénohypophyse, plus particulièrement dans les cellules corticotrophes, la CRH se fixe à son récepteur membranaire de type 1 (*type 1 corticotrophin releasing hormone receptor*: CRHR1), un GPCR dont la signalisation intracellulaire est assurée par la voie de l'adénylate cyclase/AMPC/protéine kinase A (PKA) [3]. De la même manière, la VP se lie à un GPCR, le récepteur V1b ou V3, dont la signalisation est couplée à la PLC [272]. Dans les deux cas, cette liaison active la production de POMC ainsi que la relâche d'ACTH et de β -endorphine par protéolyse de la POMC [235]. Par ailleurs, les GR présents dans les cellules corticotrophes permettent aux hormones stéroïdiennes d'exercer un rétro-contrôle négatif sur la synthèse de POMC et la relâche d'ACTH [129]. Une fois libérée dans le sang, l'ACTH rejoint les cellules des ZF/ZR où elle active la biosynthèse des glucocorticoïdes et des androgènes par sa liaison au MC2R. La signalisation du MC2R par la voie de l'adénylate cyclase/AMPC/PKA entraîne l'augmentation de l'activité de la nCEH [14] ainsi que de la transcription génique des enzymes de la synthèse des glucocorticoïdes [238].

2.3.2 La médulla surrénalienne

La sécrétion des hormones de la médullosurrénale est principalement assurée par la relâche d'acétylcholine par les terminaisons des fibres préganglionnaires du système nerveux autonome sympathique [90]. Au point de vue développemental, la médullosurrénale s'apparente à un ganglion sympathique, les cellules chromaffines ressemblant à des neurones postganglionnaires sympathiques. Cependant, les cellules chromaffines libèrent leurs hormones dans la circulation sanguine. Néanmoins, d'autres facteurs comme l'activine A [147] et les glucocorticoïdes [121] possèdent la capacité de moduler la biosynthèse et la sécrétion des catécholamines.

La séquence d'événements sous-jacents à l'induction de la relâche de catécholamines par la médullosurrénale en réponse à un stimulus est encore obscure. Il est toutefois connu que la stimulation de la médullosurrénale par les neurones préganglionnaires, eux-mêmes activés par des stimuli tels que l'exercice, l'hypoglycémie ou l'hypoxie, provoque la dépolarisation des cellules chromaffines par l'entrée de sodium causée par l'activation des récepteurs de l'acétylcholine, les récepteurs nicotiques [90;103]. Ces récepteurs font partie d'un groupe de canaux ioniques transmembranaires dont l'ouverture est dépendante de la liaison d'un messenger chimique, les récepteurs ionotropes. La dépolarisation des cellules chromaffines entraîne l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, assurant une augmentation intracellulaire de calcium qui stimule la

synthèse et le relargage des catécholamines par des mécanismes de sécrétion comme l'exocytose [103]. En effet, l'élévation intracellulaire de calcium active des protéines kinases, dont la PKC, qui phosphorylent la TH sur des résidus sérine, augmentant ainsi son activité et la synthèse des catécholamines [34]. Cette phosphorylation de la TH assure la biosynthèse des catécholamines en réponse à une stimulation aiguë, mais doit être supportée par une synthèse protéique de la TH dans les cas de stimulation chronique [34]. Par ailleurs, la PKC peut induire la voie des protéines kinases activées par un mitogène (*mitogen-activated protein kinase* : MAPK) qui interviendrait dans la régulation de la relâche des catécholamines [66].

2.4 LE DÉVELOPPEMENT DE LA SURRÉNALE

La surrénale adulte se compose de deux tissus d'origine embryonnaire distincte, le cortex et la médulla. Les cellules de la médulla proviennent des crêtes neurales alors que les cellules de la zone corticale dérivent du tissu mésodermique. La morphologie et la fonctionnalité de la surrénale adulte sont bien conservées entre les espèces. Toutefois, son développement et sa croissance chez l'humain et les primates en général diffèrent nettement de ceux des autres espèces telles que le rat.

2.4.1 Chez l'humain

Sucheston et collègues [256] ont défini cinq étapes importantes dans la croissance surrénalienne : (1) la condensation de l'épithélium cœlomique autour de la 3^e-4^e semaine de grossesse formant l'ébauche de la surrénale; (2) la prolifération et la migration des cellules épithéliales cœlomiques vers la 5^e semaine de grossesse; (3) la différenciation morphologique des cellules corticales en deux zones distinctes entre les 8^e-10^e semaines de grossesse définissant les zones fœtale et définitive; (4) le déclin et la disparition de la zone fœtale dans les mois suivants la naissance et (5) l'établissement et la stabilisation de la zonation adulte vers l'âge de 10-20 ans [183].

2.4.1.1 La corticosurrénale

À partir de la 8^e semaine, le fœtus possède une surrénale dont le cortex, bien que rudimentaire, se divise en deux zones distinctes, la zone fœtale et la zone définitive. Vers la 9^e semaine, une capsule se forme autour de la corticosurrénale et l'enveloppe complètement. Au même moment, un vaste réseau de capillaires se développe entre les cordons cellulaires de la zone fœtale. Cette vascularisation, requise

pour la libération des hormones, prédomine dans la portion centrale de la zone fœtale et persiste tout au long de la vie fœtale [183].

La croissance rapide de la corticosurrénale s'amorce vers la 10^e semaine et se poursuit jusqu'au terme de la grossesse. Toutefois, après 10-12 semaines, la morphologie de la corticosurrénale demeure relativement constante [91;183]. Vers la moitié de la grossesse, la zone fœtale représente près de 80-90% du cortex surrénalien et ses cellules possèdent les caractéristiques ultrastructurales d'une activité stéroïdogénique (liposomes, nombreuses mitochondries, réticulum endoplasmique lisse très développé). La croissance de la zone fœtale se produit principalement par hypertrophie cellulaire et est dépendante de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse fœtale. La zone définitive, mince et superficielle, est formée d'une quinzaine de cellules qui exhibent les propriétés structurales de l'état prolifératif (faible volume cytoplasmique, ribosomes libres, mitochondries petites et denses). Bien que pauvres en lipides à la mi-grossesse, les cellules en accumulent et commencent à ressembler à des cellules stéroïdogéniques actives avec la progression de la grossesse. De ce fait, les cellules de la zone définitive s'apparentent aux cellules de la ZG adulte vers la fin de la grossesse. Au cours du second trimestre de la grossesse, une troisième zone devient identifiable. Située entre les zones définitive et fœtale, il s'agirait d'une zone de transition/différenciation pourvue de cellules analogues aux cellules de la ZF de l'adulte. Ainsi, vers la 30^e semaine de grossesse, les zones définitive et transitoire exhibent respectivement les caractéristiques morphologiques des ZG et ZF et donnent au cortex l'aspect élémentaire de la corticosurrénale adulte.

Dans les mois suivant la naissance, la corticosurrénale subit un important remodelage impliquant l'atrophie par apoptose de la zone fœtale [250] par le récepteur AT₂ [51] et une vague de différenciation menant au développement des ZG et ZF. La ZR correspondrait quant à elle à la dégénérescence de la zone fœtale [183]. Il existe deux courants de pensée en rapport avec la croissance et la différenciation qui prennent place dans la corticosurrénale fœtale et mènent à la zonation fonctionnelle définitive [277]. La théorie de la zonation (Figure 14, scénario A) émet l'hypothèse que chacune des zones se développe indépendamment les unes des autres. Cette théorie est basée sur l'observation de cellules en mitose dans chacune des trois zones corticales. Chez le rat, l'expression précoce du CYP11B1 dans les ZF/ZR suivie par l'apparition du CYP11B2 dans les cellules sous-jacentes à la capsule en fin de gestation supporte ce concept [279]. Le modèle de la migration (Figure 14, scénario B1) propose l'existence d'une population de cellules précurseurs sous

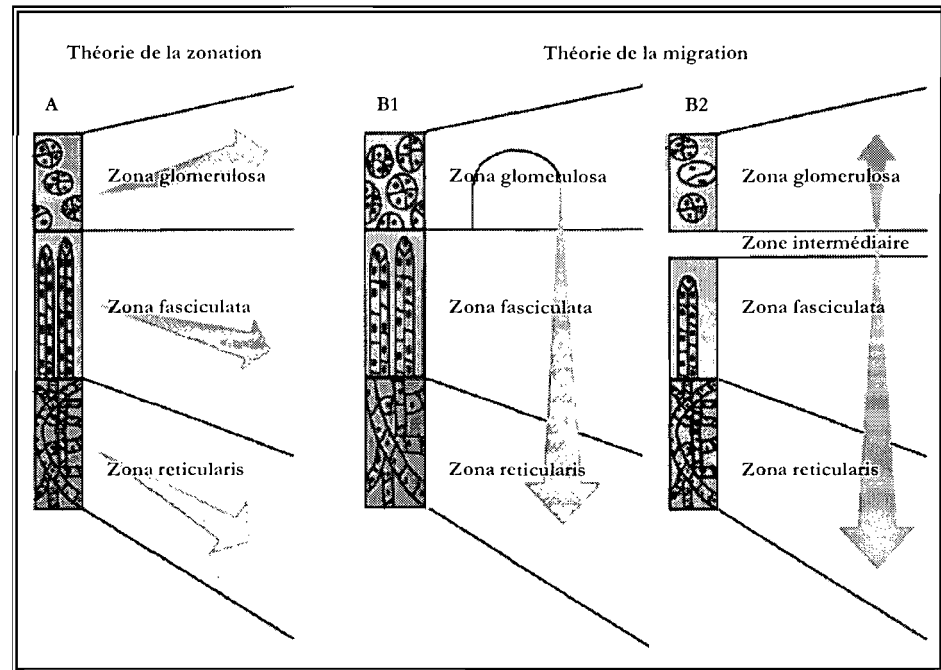


Figure 14. Les modèles expliquant la formation des zones corticales de la surrénale.

Adaptée de [277].

la capsule de la surrénale. Ces cellules se différencieraient d'abord en cellules de la ZG et changeraient de phénotype au fur et à mesure de leur migration centripète vers les ZF/ZR où elles mourraient. Cette théorie repose sur des observations-clés : les études d'incorporation de thymidine tritiée révèle une migration centripète des cellules corticales de la zone externe vers la zone interne [286]; il existe une intense prolifération sous-capsulaire résultant de l'énucléation (ablation de la médulla et du cortex interne sans atteinte de la ZG) permettant la croissance centripète et la zonation de la surrénale à partir des cellules précurseurs [85] et des analyses du profil d'expression d'un transgène du CYP21 suggèrent une origine clonale commune aux lignées cellulaires des zones de la corticosurrénale [191]. Ainsi, ces travaux supposent la présence d'une zone de cellules pluripotentes capables de se différencier et de former les trois types cellulaires de la corticosurrénale. De plus, des études immunohistochimiques, à l'aide de marqueurs spécifiques des ZG (CYP11B2) et ZF (CYP11B1), révèlent l'existence chez le rat d'une zone de cellules indifférenciées n'exprimant aucun des deux marqueurs [188]. Située entre les ZG et ZF plutôt que sous la capsule, les cellules de cette zone intermédiaire migreraient vers l'extérieur pour alimenter la ZG et vers l'intérieur pour repeupler la ZF (Figure 14, scénario B2).

2.4.1.2 L'ontogénie des enzymes stéroïdogéniques

La surrénale fœtale joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie intra-utérine et dans l'induction de la maturation fonctionnelle de plusieurs organes pour préparer le fœtus à sa (sur)vie extra-utérine. Pour assumer ces fonctions, la surrénale fœtale sécrète des hormones stéroïdes, en particulier du DHEA et son dérivé sulfaté ainsi que du cortisol.

Très tôt pendant le développement, les cellules de la zone fœtale expriment les CYP11A et CYP17 permettant la synthèse en grande quantité de DHEA et de DHEA-sulfate, les substrats des œstrogènes placentaires. Toutefois, l'absence de 3β HSDII dans ces cellules les rend incapables de produire des minéralocorticoïdes ou des glucocorticoïdes à partir de la prégnénolone, et ce, malgré l'expression du CYP21. L'augmentation des œstrogènes dans la circulation maternelle autour de la 12^e semaine de grossesse coïncide avec la croissance hypertrophique de la zone fœtale et la production d'ACTH par l'hypophyse fœtale [183].

Bien que les CYP11A, CYP17, CYP21 et CYP11B (CYP11B1/2 confondus) soient détectés dans les zones définitive et de transition dès la mi-grossesse, ce n'est que vers la fin de la gestation que les cellules de ces zones acquièrent la capacité de produire *de novo* de l'aldostérone et du cortisol par l'expression de la 3β HSDII [183]. Ainsi, la synthèse de minéralocorticoïdes par la surrénale fœtale est très faible en début de gestation. Après la 16^e semaine, les cellules de la zone définitive expriment néanmoins les récepteurs AT₁ et AT₂ à leur surface [38] dénotant que la synthèse minimale d'aldostérone est due autant à l'absence de réponse à l'AngII qu'à la carence de l'expression de la 3β HSDII. À terme, près de 80% de la concentration sanguine fœtale d'aldostérone provient d'une synthèse surrénalienne par le fœtus. L'ontogénie de la sécrétion de cortisol par la corticosurrénale fœtale est toutefois plus nébuleuse. D'après des observations cliniques et des études *in vitro* à partir de tissu fœtal, la surrénale doit produire du cortisol de façon précoce pendant la grossesse afin d'exercer un contrôle négatif sur la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse du fœtus. Sa synthèse *de novo* n'a été mise en évidence que récemment par le groupe de Goto et collègues [112]. Leurs travaux démontrent la présence transitoire de la 3β HSDII, expression qui est corrélée avec la biosynthèse de cortisol dont la concentration atteint un maximum à 8-9 semaines de grossesse.

Ces observations indiquent que chacune des zones de la corticosurrénale fœtale possède un rythme de maturation fonctionnelle qui dépend de l'ontogénie de l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse. De cette manière, la corticosurrénale fœtale se compose de trois zones distinctes autant du point de vue morphologique que fonctionnel : (1) la zone définitive s'apparente à la ZG de la surrénale adulte par l'acquisition de sa capacité à synthétiser des minéralocorticoïdes en fin de grossesse; (2) la zone de transition analogue à la ZF où a lieu la production des glucocorticoïdes par l'expression des enzymes spécifiques à leur synthèse et (3) la zone fœtale qui produit de façon précoce d'importantes quantités de DHEA et de DHEA-sulfate [183].

2.4.1.3 La médullosurrénale

Le système nerveux sympathique dérive des sympathogonies de la crête neurale. Aux environs de la 5^e semaine de grossesse, les sympathogonies migrent vers la région thoracique où elles forment les chaînes sympathiques de part et d'autre de la colonne vertébrale et se différencient en cellules catécholaminergiques. Par la suite, une certaine population de ces cellules migre vers la région ventrale et envahisse la corticosurrénale où elles forment une médulla rudimentaire, mais détectable dès la 8^e semaine. En fait, la médulla est virtuellement absente de la surrénale fœtale en ce sens qu'elle ne représente qu'une structure discrète de petits îlots de cellules chromaffines immatures dispersés dans la surrénale. En étroite association avec les cellules de la corticosurrénale, les cellules catécholaminergiques se différencient en cellules chromaffines dans lesquelles des granules de sécrétion sont décelables autour de la 12^e semaine. Dans cet environnement, les cellules catécholaminergiques sécrétrices de norépinéphrine se transforment en cellules chromaffines productrices d'épinéphrine. Suite à l'involution de la zone fœtale au cours des premières semaines post-natales, les cellules chromaffines se regroupent et se fusionnent autour de la veine centrale. Vers la 4^e semaine de vie post-natale, la majorité des cellules sont regroupées au centre de la glande. Ce n'est toutefois qu'après 12-18 mois suivant la naissance que la médulla prend l'apparence qu'elle possède au sein de la surrénale mature [90;123;140;183].

2.4.1.4 L'ontogénie des enzymes cathécolaminergiques

La relâche de catécholamines par la médullosurrénale joue un rôle vital dans la préparation et l'adaptation de l'organisme fœtal à sa (sur)vie extra-utérine. Toutefois, peu d'études témoignent de

l'ontogénie des enzymes responsables de leur biosynthèse. Les cellules chromaffines acquièrent précocément leur phénotype adulte en exprimant dès la 7^e semaine de grossesse les gènes de la *TH* [189] et de la *DβH* [288] et plus tardivement, de la *PNMT* [288]. Le contenu en catécholamines de la surrénale fœtale est donc détectable autour de la 10^e-16^e semaine selon la sensibilité de la technique utilisée (chromatographie liquide de haute performance *vs* radioimmunoessai) [104;274].

2.4.2 Chez le rat

Chez le rat, l'ébauche de la surrénale, visible à G13 [200], dérive du tissu mésenchymateux adjacent à l'épithélium cœlomique présent dans les crêtes génitales [186]. La surrénale apparaît vers G16 comme une masse encapsulée dans laquelle se trouvent des cellules destinées à la formation du cortex surrénalien [138;282]. Wotus et collègues [279] ont démontré que les phénotypes cellulaires associés aux ZG et ZF/ZR sont présents dès G16 et qu'ils sont fonctionnellement compétents puisqu'il existe une biosynthèse d'aldostérone et de corticostérone par l'expression des *CYP11A*, *CYP21* et *CYP11B* [186]. Néanmoins, la zonation définitive du cortex surrénalien tel qu'il apparaît chez l'adulte, à savoir une ZG externe et une ZF/ZR interne, ne survient qu'à G18 [186;187;279]. Par ailleurs, la synthèse de stéroïdes par la corticosurrénale fœtale serait déjà soumise à une régulation par l'AI et l'ACTH puisque les récepteurs *AT₁* et *AT₂* [186;240;241] et *MC2R* [54] sont exprimés à partir de G16.

Les cellules de la médullosurrénale proviennent de la crête neurale [279] à partir de laquelle elles migrent vers l'ébauche corticale entre G13-G15 [282]. Ces cellules précurseuses qui expriment le gène de la *TH* [270;282] s'accumulent à l'extérieur du primordium pour ensuite s'y infiltrer [200;279]. Leur migration à l'intérieur de l'ébauche prend fin à G17 [282]. Les cellules précurseuses acquièrent la capacité de produire de l'épinéphrine par l'expression génique de la *PNMT* à G16 [237] ou G18 [270] en se différenciant en cellules chromaffines. Des travaux suggèrent que cette différenciation serait dépendante des glucocorticoïdes et de la fonctionnalité du GR dont la présence est détectable à G17 [237]. Toutefois, Kennedy et collègues [150] ont plutôt démontré que l'expression initiale de la *PNMT* dans les cellules chromaffines est indépendante des glucocorticoïdes, mais que la présence du GR permet une synthèse accrue d'épinéphrine. Il apparaît que la conversion complète des cellules précurseuses en cellules chromaffines donne à la médullosurrénale sa forme définitive dès G19 [10], même s'il existe une dispersion des cellules positives pour la *TH* au sein du cortex surrénalien

jusqu'aux premiers jours de la vie post-natale [186;187], indiquant une maturation tardive de la médullosurrénale.

3. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

La croissance fœtale résulte de l'interaction de nombreux facteurs, incluant entre autres des facteurs maternels (âge et taille maternel, capacité pelvienne et utérine, état respiratoire et cardiocirculatoire, condition nutritionnelle, statut hormonal), le bagage génétique du fœtus et des facteurs environnementaux (classe sociale, guerre). Issu du fœtus, mais étroitement lié à la mère, le placenta joue également un rôle primordial dans la modulation du développement intra-utérin et de la croissance fœtale par ses fonctions sécrétoires (hormones stéroïdiennes, facteurs de croissance, cytokines) et ses capacités d'échanges (oxygène, nutriments, déchets).

Le placenta est supporté dans ses activités par les importantes modifications de l'homéostasie maternelle, incluant l'expansion volémique, et de la circulation utérine au cours de la grossesse. En fait, chez la rate, le diamètre des artères utérines double en fin de gestation [251]. Cependant, lorsqu'une diète faible en sodium est donnée à des rates au cours du dernier tiers de gestation, l'expansion volémique maternelle [228] et l'augmentation du diamètre des artères utérines [252] sont considérablement réduites. Ces observations sont associées à une diminution du poids du placenta ainsi qu'à une RCIU chez les fœtus [228]. D'après une étude comportementale conduite chez ces animaux, ces changements sont accompagnés d'une redistribution du flot sanguin vers les organes nobles (cerveau, cœur, surrénale) au détriment des organes et tissus périphériques du fœtus (rein) [26]. Il apparaît ainsi que la diète faible en sodium chez la rate gestante serait associée à une perturbation de la circulation utéro-placentaire.

Par ailleurs, des travaux ont démontré que l'invasion endovasculaire – nécessaire au remodelage des artères de la vasculature utérine et à l'établissement de la circulation utéro-placentaire – se produit autour de G13 chez la rate [45], laissant présager une interférence de la diète faible en sodium avec le développement du placenta dans notre modèle animal de RCIU. De plus, d'autres études indiquent que le développement et la maturation de la surrénale fœtale surviennent au cours de la dernière semaine de gestation chez le rat [186;279;282], suggérant cette fois encore un effet de la diète faible en sodium sur la croissance de cette glande.

Ainsi, ces différents travaux jumelés aux observations produites à partir de notre modèle animal de RCIU nous ont amenés à formuler deux hypothèses, à savoir :

- A) La RCIU observée chez les fœtus de rates recevant une restriction sodique au cours de la dernière semaine de gestation est associée à une hypoxie placentaire.**
- B) La stéroïdogénèse surrénalienne et la synthèse des catécholamines sont modifiées chez les fœtus RCIU, influençant la sécrétion hormonale.**

CHAPITRE 2. MANUSCRIT 1

**PLACENTAL HYPOXIA IN A RAT MODEL OF INTRAUTERINE GROWTH
RESTRICTION INDUCED BY A LOW-SODIUM DIET**

TITRE, AUTEURS, SOUMISSION ET CONTRIBUTION DU MANUSCRIT 1

Titre. Placental hypoxia in a rat model of intrauterine growth restriction induced by a low-sodium diet

Auteurs. Karine Bibeau, Rébecca Gaudet, Roy Kazan et Michèle Brochu

Soumission. En préparation, soumission prochaine dans *Placenta*

Contribution. Avec l'aide et l'appui du Dre Michèle Brochu, j'ai construit ce projet et planifié les manipulations. Madame Rébecca Gaudet et Monsieur Roy Kazan ont fourni une participation technique à cet article en produisant les expériences sur la méthylation du promoteur de p53 et l'expression des GLUT, respectivement. Tous les autres résultats proviennent d'expériences que j'ai personnellement faites. J'ai par la suite rédigé l'article, avec les conseils et sous la supervision du Dre Michèle Brochu.

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU MANUSCRIT 1

Hypoxie placentaire dans un modèle de restriction de croissance intra-utérine induite par une diète faible en sodium chez le rat

Nous avons développé un modèle animal de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) en donnant une diète faible en sodium à des rates au cours de la dernière semaine de gestation. Ce traitement empêche l'expansion volémique maternelle et l'augmentation du diamètre des artères utérines et conduit à une diminution du poids des placentas par rapport à la gestation normale, suggérant une modification de la perfusion utéro-placentaire. Nous proposons que la RCIU observée dans notre modèle soit associée à une hypoxie placentaire. Au cours de la dernière semaine de gestation, la moitié des rates a reçu une diète faible en sodium. Au jour 22 (terme=23jours), les rates ont été sacrifiées et les placentas ont été prélevés et congelés. L'expression génique du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) et de ses récepteurs ainsi que des transporteurs de glucose (GLUT) a été évaluée par transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne (PCR) tandis que l'expression protéique du VEGF, des synthases du monoxyde d'azote (NOS) et des GLUT a été mesurée par ELISA ou immunobuvardage de type Western. La localisation du VEGF a été effectuée par immunohistochimie. L'activité de la catalase et superoxyde dismutase a été évaluée par des tests colorimétriques. Les nitrotyrosines ont été détectées par « slot blot ». L'expression protéique des protéines pro-apoptotiques (Bax, p53) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_l) a été mesurée par immunobuvardage de type Western. La méthylation du promoteur de p53 a été évaluée par PCR. Nous avons observé dans les placentas RCIU une diminution de l'expression génique du VEGF, mais une augmentation de sa protéine, en particulier dans la zone labyrinthe, des niveaux plus élevés de l'ARNm du VEGFR1, une augmentation protéique de la NOS endothéliale et une augmentation de l'index apoptotique et de la protéine p53. Nos résultats démontrent que la restriction de croissance placentaire et fœtale observée dans notre modèle est médiée, en partie, par une hypoxie et une apoptose placentaires.

Mots-clés : facteur de croissance vasculaire endothéliale, synthase du monoxyde d'azote, transporteur de glucose, apoptose

Placental hypoxia in a rat model of intrauterine growth restriction induced by a low-sodium diet

Short title: Placental hypoxia and IUGR

Karine Bibeau, Rébecca Gaudet, Roy Kazan and Michèle Brochu

Research Centre, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5 and Department of Obstetrics and Gynecology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3T7

Corresponding author: Michèle Brochu, Research Centre, CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5; Tel: (514) 345-4931 ext. 5035; Fax: (514) 345-4801;



Conflict of interest: The authors have nothing to disclose.

ABSTRACT

We have developed an animal model of intrauterine growth restriction (IUGR) by giving a low-sodium diet to dams over the last week of gestation. This treatment prevents the expansion of maternal circulating volume and the increase in uterine artery diameter and leads to reduced placental weight compared to normal gestation, suggesting an altered uteroplacental perfusion. We proposed that IUGR seen in our model is associated with placental hypoxia. During the last week of gestation, half of the dams received a low-sodium diet. On day 22 (term=23 days), rats were sacrificed and placentas were collected and snap frozen. Gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors as well as glucose transporters (GLUT) was evaluated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) whereas the protein expression of VEGF, nitric oxide synthases (NOS) and GLUT was measured by ELISA or Western blot. VEGF localisation was performed by immunohistochemistry. The activity of superoxide dismutase and catalase were evaluated by colorimetric assays. Nitrotyrosine proteins were detected by slot blot. Protein expression of pro-apoptosis proteins (Bax, p53) and anti-apoptosis proteins (Bcl-2, Bcl-X_L) was measured by Western blot. p53 promoter methylation was evaluated by PCR. We observed in IUGR placentas a decreased VEGF gene expression, but an increase in its protein levels, particularly in the labyrinth zone, higher levels of VEGFR1 mRNA, an augmentation in endothelial NOS protein expression and an increased apoptotic index and p53 protein expression. Our data suggest that reduced placental and foetal growth observed in our model might be mediated, in part, through placental hypoxia and apoptosis.

Key terms: vascular endothelial growth factor, nitric oxide synthase, glucose transporter, apoptosis

INTRODUCTION

The aetiology of abnormal foetal growth i.e. intrauterine growth restriction (IUGR) is not well understood, around 40% of IUGR cases being idiopathic [1]. Clinical and basic research data suggest that IUGR results from maladaptation and malinvasion of uteroplacental arteries, which increase uteroplacental vascular resistance and may compromise uteroplacental perfusion as well as maternal-foetal transport of oxygen (O_2) and nutrients [2]. In the placenta, O_2 is supplied by the maternal blood flow and simultaneously extracted by the foetal blood stream. Thus, alterations at one or both ends lead to O_2 tension changes within the placenta and impair the balance of the intervillous O_2 pressure.

Adaptations to decreased O_2 levels are mainly mediated by the hypoxia-inducible transcription factor (HIF). Upon hypoxic stabilization, HIF transactivates O_2 -regulated genes, such as the vascular endothelial growth factor (VEGF), the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the facilitative glucose transporters (GLUTs). GLUTs upregulation is required to maintain energy levels via the switch to anaerobic metabolism [3]. iNOS through NO^{\bullet} generation regulates vascular tone by mediating endothelium-dependant vascular relaxation and thus, increasing local blood flow [4]. Similarly, VEGF promotes new blood vessel growth to enhance blood flow and the amount of O_2 delivered to the hypoxic tissue [5]. VEGF binds to two distinct receptor tyrosine kinases termed VEGF receptor-1 and -2 (VEGFR1 and 2) [6]. VEGF can induce upregulation of both endothelial NOS (eNOS) and iNOS in endothelial cells via VEGFR2, further supporting the role of NO^{\bullet} in hypoxic-mediated endothelial function and angiogenesis [7]. However, NO^{\bullet} has also negative properties as a member of the reactive nitrogen species. Indeed, under certain conditions, NO^{\bullet} can react with reactive oxygen species (ROS), and be converted in more reactive redox derivatives that can attack proteins, lipids and DNA [8].

ROS released during hypoxia has been proposed as a signalling pathway in the detection of O_2 surrounding levels [9]. The primary defence against ROS is the superoxide dismutase (SOD). This enzyme rapidly converts the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2), which is transformed into water by the enzymes catalase and glutathione peroxidase [8]. In cases of $O_2^{\bullet-}$ accumulation or increases in NO^{\bullet} concentrations, NO^{\bullet} competes with SOD for the removal of $O_2^{\bullet-}$ by forming the peroxynitrite anion ($ONOO^-$). $ONOO^-$ is commonly implicated as a mediator of tyrosine nitration and oxidation, a process that can alter protein functions [8].

Whereas severe and prolonged hypoxia can initiate apoptosis, cells often adapt to acute or mild hypoxia and survive [10]. Depending upon the stimuli, apoptosis can be initiated by two interrelated signalling pathways: the death receptor-mediated pathway induced by ligands such as TNF α and the mitochondrial pathway. In the latter, apoptosis is triggered by exogenous stimuli like DNA damage or hypoxia and the death signal is transmitted through the mitochondria. This pathway involves alterations in the expression of p53 and members of the Bcl-2 family [11].

Studies on rat placental development have shown that trophoblast invasion is initiated around day 13, increased and reached a peak on day 18 [12;13]. We reported that giving a low-sodium diet to rats for the last week of gestation results in the birth of IUGR pups [14]. The reduced maternal circulating volume expansion accompanied by the decreased uterine arcuate artery diameter and placental weight compared to normal gestation, indicate poor placental perfusion which could be involved in the IUGR seen in our model [14;15]. Lower plasma volume expansion has been observed in women with idiopathic IUGR [16;17], making our IUGR model relevant to the human condition. In view of these, we have hypothesized that IUGR observed in our animal model could be associated with placental hypoxia. The aim of the current study was to evaluate the expression of hypoxia-inducible genes (VEGF, NOS, GLUT), oxidative/nitrosative stress markers (SOD, catalase, nitrotyrosines) as well as pro- (Bax, p53) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-X_l) proteins in normal and IUGR term-placentas. Moreover, we examined foetal IUGR kidneys in order to look for foetal hypoxia by evaluating VEGF expression and apoptosis-related markers.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This study was approved by the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec, Canada) weighing 225-250 g were mated with a known fertile male. Day 1 of pregnancy was determined by the presence of spermatozoa in morning vaginal smears. All animals were housed under controlled lighting (6AM-6PM) and temperature ($21 \pm 3^\circ\text{C}$). The dams were randomly assigned to 1 of 2 diets for the last 7 days of gestation (term=day 23). One group was fed a normal diet containing 0.2% sodium (normal diet 5755; PMI Feed Inc., Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and tap water. Their fetuses comprised the control group. The second group received a 0.03% sodium diet (low-sodium diet 5882; PMI Feed Inc.) and demineralized water. Their foetuses suffered from IUGR (IUGR *vs* control: male: 4.7 ± 0.5 g *vs* 5.2 ± 0.5 g, $P < 0.001$ and female: 4.4 ± 0.5 g *vs* 4.9 ± 0.4 g, $P < 0.001$) as previously shown [14].

Tissue collection

On day 22 of gestation, animals were sacrificed (8AM-9AM) by decapitation. Placentas ($n=1$ is 3-4 placentas per dam) and sex-separated foetal kidneys ($n=1$ is 3-4 pooled kidneys per sex per litter) were quickly removed and snap-frozen in liquid nitrogen. For histology and immunohistochemistry, placentas and foetal kidneys were immediately immersed in 10% formaline and then embedded in paraffin. Trunk blood of mothers as well as of their male and female foetuses was rapidly collected after decapitation in plain tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged at $1,550$ g for 20 min at 4°C . Serum was stored at -80°C until its use to measure glucose by potentiometry ($n=15$ dams or sex-pooled litters per group).

DNA isolation and p53 promoter methylation

Total DNA from frozen placentas ($n=6$ /group) was extracted by DNeasy tissue kit (Qiagen Sciences, Mississauga, Ontario, Canada) according to the procedure detailed by the manufacturer. Until use, final DNA eluates were stored at -80°C . DNA concentrations were determined by absorbance measurement at a wavelength of 260 nm and the integrity of samples was determined by the 260/280 nm ratio.

The methylation status of the p53 promoter region was determined as described by Pogribny *et al.* [18]. Briefly, control and IUGR placental DNA were treated with the methylation-sensitive

restriction enzymes *HinP1I*, *AclI* and *BstUI* according to the procedure detailed by the manufacturer (New England Biolabs, Beverly, MA). Conventional PCR was then performed in a total volume of 50 μ l where each PCR reaction contained 0.5 μ g of DNA (with or without restriction enzyme pre-treatment), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 25 pM of each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada). A DNA segment from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene that contains no CpGs was amplified and used as an internal control. Negative control containing no DNA was done. Cycle parameters consisted of an initial denaturation step at 95°C for 7 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, primers (Table 1) annealing at 54°C for 60 s and extension at 72°C for 90 s. Then, 10 μ l of each PCR product were then applied on a 1.5% agarose gel, electrophoresed, visualized by ethidium bromide (EtBr) staining and quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA from control and IUGR placentas (n=6/group) and foetal kidneys (n=6/group) was extracted by TRIzol reagent (Invitrogen Canada Inc.). Final RNA pellets were dissolved in an appropriate volume of diethylpyrocarbonate water and stored at -80°C. RNA concentration was established by absorbance measurement at a wavelength of 260 nm, integrity of the samples was ascertained by the 260/280 nm ratio, and quality was verified by EtBr fluorescence.

PCR primers specific for genes of interest (Table 1) were designed with PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi) based on sequence data from the National Center for Biotechnology Information. Single-stranded cDNA was created by RT (SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase, Invitrogen Canada Inc.) and PCR (Taq DNA Polymerase, Invitrogen Canada Inc.), employing the procedure detailed by the manufacturer. The annealing step was carried out for 1 min at temperatures established for each gene in placentas and foetal kidneys (Table 1). The extension step was performed at 72°C for 1 min. PCR results were collected in the middle of the exponential phase. The number of cycles needed for amplification was established for each gene in each tissue (Table 1). To ensure that genomic DNA was not amplified, RT was performed without enzyme and PCR done as previously described. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels, visualized by EtBr staining and quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). The procedure was conducted on triplicate samples. The results are reported on GAPDH as internal control.

VEGF immunohistochemistry

Whole placentas (9 control placentas from 3 different litters and 11 IUGR placentas from 4 different litters) and foetal kidneys (12 kidneys per sex per group from 3 different litters) were treated with incremental concentrations of alcohol, followed by xylene and paraffin. Slices of 6 μm thickness were prepared and immunohistochemical analysis were performed to assess the presence of VEGF. Sections were deparaffinized in xylene and hydrated in ethanol. After blocking of endogenous H_2O_2 and nonspecific antibodies, the slices were treated serially with the primary rabbit anti-VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), the secondary biotinylated goat anti-rabbit antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA), incubated with avidin/biotin complex (ABC kit, Vector Laboratories), treated with 3-3'-diaminobenzidine chromogen substrate (DAB kit, Vector Laboratories) and, finally counterstained with haematoxylin and mounted. Immunolabelling was acquired using an Olympus microscope BX-60 equipped with QImaging Retiga 2000R camera (Olympus, Markham, Ontario, Canada) and quantified by Image Pro 6.1 plus (MediaCybernetics, Silver Spring, MD).

VEGF, GLUT1, GLUT3, eNOS, iNOS, Bax, Bcl-2, Bcl-X_L and p53 protein expression

Frozen placentas (n=10/group) or foetal kidneys (n=10/group) were homogenized in a commercial lysis buffer (1:4 w/v) and centrifuge at 12,000 *g* for 15 min at 4°C. Supernatants were used to determine VEGF protein concentrations by an ELISA commercial kit according to the procedure detailed by the manufacturer (RayBio® Rat VEGF Elisa kit, RayBiotech, Inc., Norcross, GA).

Frozen placentas (n=6 or 12 [for GLUTs]/group) or foetal kidneys (n=6/group) were homogenized in Tris buffer (1:4 w/v) containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate and 1X complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Indianapolis, IN) and centrifuged at 12,000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatants were collected and protein concentrations were determined with the Bio-Rad assay kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada), with bovine serum albumin (BSA) as standard. The supernatants were then resuspended in Laemmli buffer. For comparative purposes, equal amounts of proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Non-specific sites on membranes were blocked in 5% dried milk or BSA (for Bcl-2) in phosphate-buffered saline (PBS; 1.4 M NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 17.6 mM KH_2PO_4 ,

pH 7.4)/0.1% Tween 20. For protein detection, nitrocellulose membranes were incubated in the antibodies to rabbit anti-GLUT1 (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), rabbit anti-GLUT3 (1:250; Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-eNOS (1:500; BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada), mouse anti-iNOS (1:1,000; BD Biosciences), rabbit anti-Bax (1:2,000 for placentas and 1:1,000 for foetal kidneys; Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA), rabbit anti-Bcl-2 (1:500 for placentas and 1:1,000 for foetal kidneys; Cell Signalling Technology Inc.), mouse anti-Bcl-X_L (1:2,000; BD Biosciences) and rabbit anti-p53 (1:1,000; Cell Signalling Technology Inc.). Membranes were then washed, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse or anti-rabbit IgG (1:5,000; Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom). Equal protein loading was determined on the same membrane by mouse anti- β -actin primary antibody (1:100,000; Novus Biologicals Inc., Littleton, CO). Immunoreactive bands were visualized with the ECL Western blotting analysis system (GE HealthCare Biosciences Inc., Montréal, Québec, Canada) and quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). The results are expressed as densitometric units relative to β -actin.

SOD and catalase activity

Frozen placentas (n=10/group) were homogenized (1:4 w/v) in either 50 mM KH₂PO₄ and 1 mM EDTA, pH 7.4 (for catalase) or 20 mM HEPES, pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol and 7 mM sucrose (for SOD) and centrifuge at either 10,000 g for 15 min at 4°C (for catalase) or 1,500 g for 5 min at 4°C (for SOD). Supernatants were used to measure enzyme activity by commercial kits according to the procedure detailed by the manufacturer (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Protein nitration assay

Tyrosine nitration was quantified by slot-blot as described by Beauchamp et al. [19]. Briefly, frozen placentas (n=6/group) were homogenized Tris buffer (1:4 w/v) containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate and 1X complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche). The homogenates were centrifuged at 12,000 g at 4°C for 30 min, and the supernatants were collected. Protein concentrations were determined with the Bio-Rad assay kit (Bio-Rad). For comparative purposes, equal amounts of protein (10 μ g/lane) were loaded in a final volume of 100 μ L in PBS. Nitrocellulose membrane was placed in a Hybri-Slot manifold apparatus (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD) and

washed with PBS; 100 μ L of PBS-diluted protein solution were allowed to passively diffuse for 30 min and then washed with PBS. The membrane was removed from the apparatus, washed briefly with PBS, and blocked with PBS/0.1% Tween 20 containing 5% dried milk for 1 h at room temperature. The membrane was incubated overnight at 4°C with anti-nitrotyrosine polyclonal antibody (1:5,000, Upstate, Lake Placid, NY), washed, and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit IgG (1:5,000; Amersham) for 30 min at room temperature. Immunoreactive bands were visualized with the enhanced ECL chemoluminescence detection system (GE HealthCare Biosciences Inc.) and quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). The membrane was finally incubated with Ponceau-S to normalize for loading.

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm SE and compared using Student's *t* test. Statistical significance was assumed with a value of $P < 0.05$.

RESULTS

Signs of placental hypoxia

In order to investigate the presence of hypoxia in IUGR placentas, VEGF, NOS and GLUT expression, all known as hypoxia-induced genes, was determined [3;4;6]. Compared to control placentas, VEGF mRNA expression in IUGR ones was reduced (Fig. 1A). However, protein expression determined by ELISA (Fig. 1B) and by immunohistochemistry (Fig. 1C, D) showed that VEGF protein levels were higher in IUGR placentas, in particular in the labyrinth zone. These changes were accompanied by an increase in VEGFR1 gene expression (Fig. 1E). VEGFR2 mRNA levels were similar in the two groups (Fig. 1E). As shown in Fig. 2, eNOS protein expression was increased in IUGR placentas, but iNOS protein expression was similar in IUGR placental samples compared to controls. GLUT1 and GLUT3 mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) expression were decreased in IUGR placentas but a statistical significance was only reached for GLUT1 mRNA levels. At term, serum glucose levels (mmol/L) were similar between low-sodium pregnant rats (5.4 ± 1.0) and their controls (5.6 ± 0.6) as well as between IUGR (male: 4.5 ± 1.1 ; female: 4.4 ± 0.9) and control (male: 4.7 ± 0.5 ; female: 4.0 ± 0.6) fetuses.

Also, in an attempt to check for the presence of NO[•]-induced oxidative damages, SOD and catalase activity, the primary defences against ROS, and nitrotyrosine protein abundance, a biomarker of NO[•]-dependent oxidative stress, were determined [8]. The enzymatic activity of SOD (IUGR: 4.5 ± 0.9 ; control: 4.2 ± 0.6 U/mL) and catalase (IUGR: 10.3 ± 0.8 ; control: 8.9 ± 0.7 mmol/min/mL) as well as nitrotyrosine protein abundance (IUGR: 0.9 ± 0.1 ; control: 0.9 ± 0.4 arbitrary units) were unchanged in IUGR placentas compared to control ones.

Hypoxia can initiate apoptosis via alterations in the expression of p53 and members of the Bcl-2 family [10]. In IUGR placentas, Bax (Fig. 4A), Bcl-2 (Fig. 4B) and Bcl-X_L (Fig. 4C) protein expression was not significantly different between IUGR placentas and their controls. However, ratios of Bax/Bcl-2 (Fig. 4E) and Bax/Bcl-X_L (Fig. 4F) were higher in IUGR placental samples, but reached a statistical significance for the Bax/Bcl-X_L ratio only, suggesting the presence of a greater apoptosis in this group. CpG methylation was slightly reduced at all restriction sites studied in the IUGR placentas when compared to controls, but no one reached a statistical difference (Fig. 5A). p53 protein levels were augmented in IUGR placentas (Fig. 5B). This result emphasizes the previous finding of increased placental apoptosis.

Signs of foetal hypoxia

VEGF gene expression was similar in the kidneys from IUGR male or female foetuses and their controls (Fig. 6A). However, in IUGR male foetuses, VEGF protein levels measured by ELISA (Fig. 6B) and immunohistochemistry (Fig. 6C, D) were reduced.

Kidneys from IUGR male and female foetuses did not present any differences in Bax (Fig. 7A) and Bcl-2 (Fig. 7B) protein expression, and the resulting Bax/Bcl-2 ratio was unchanged (Fig. 7C).

DISCUSSION

In this study, we showed in IUGR placentas 1) a decreased VEGF gene expression with an increase in its protein levels, particularly in the labyrinth zone, 2) higher levels of VEGFR1 mRNA, 3) an increased eNOS protein expression, 4) an elevated apoptotic index and 5) an augmented p53 protein expression. In kidneys from IUGR foetuses, a decreased VEGF protein expression was found in males.

VEGF expression is regulated by a diversity of stimuli among which hypoxia is a well-known major inducer. Indeed, in conditions of low O₂ levels, the transcriptional activator HIF binds to the hypoxic response element found in the VEGF gene promoter region to stimulate its transcription. Also, different mechanisms participate in the post-transcriptional regulation of VEGF synthesis, with hypoxia increasing the efficiency of translation for example [6]. The existence of such regulatory points could account for the discordance between VEGF mRNA and protein levels that we observed in growth-restricted placentas. Nevertheless, we found in IUGR placentas compared to control ones an increase in VEGF protein expression accompanied by higher mRNA levels of VEGFR1. Immunohistochemistry analysis revealed that this increase in VEGF expression is mainly localized in the labyrinth zone which is the site of foetomaternal exchanges over the last third of gestation in rats and thus, an extensive vascularised zone. These results suggest the presence of placental hypoxia in our IUGR animal model. To our knowledge, only one study measured VEGF placental levels in a rat model of IUGR. Indeed, Hewitt et al. have shown that glucocorticoid excess during foetal life prevented the normal gestational increase in VEGF expression, indicating that glucocorticoid-induced placental and foetal growth restriction in this model was partly mediated through an inhibition of VEGF expression and the consequent reduced placental vascularisation [20]. In IUGR human placentas, studies reported inconsistencies about the levels of VEGF, some describing higher [21], unaltered [22] or lower [23] expression, but overall available data indicate that placental VEGF mRNA expression may be up-regulated in cases of IUGR where placental hypoxia is present [24]. Also, as studies on the homozygous disruption of VEGFR1 revealed that this receptor is involved in the assembly of placental blood vessels in a vast network [25], the increased in its expression found in IUGR placentas further support the notion of placental hypoxia.

In humans and animals, glucose is the main source of energy for the foetus and the placenta, which both depend on the mother for their supply of glucose [26]. Glucose transport is carried out by

GLUTs found on the maternal and foetal sides of the trophoblast and foetal endothelial cells, and is achieved by both GLUT1 and GLUT3 isoforms in the rat placenta [27]. Under hypoxic conditions, transcription of GLUTs is up-regulated [3]. However, in our IUGR model, this was not the case. In fact, GLUT1 mRNA levels were even lower in growth-restricted placentas compared to control ones. Similar findings have been obtained from human high altitude pregnancies in which there is a chronic placental hypoxia and a reduced birth weight. This indicates that, *in vivo*, hypoxia is not the main factor regulating GLUT1 levels. Probably, some growth factors such as insulin modulate its expression [28]. Nevertheless, glucose content being unaltered in maternal as well as in foetal serum in our IUGR animal model, these results are consistent with the absence of significant changes in protein expression of both GLUT1 and GLUT3.

The production of NO[•] via NOS is thought to cause dilatation of placental vasculature as well as to participate to endovascular invasion and vessel remodelling of the developing placenta, which are both necessary to the establishment of a functional uteroplacental circulation [29]. In our IUGR model, placental growth restriction is associated with higher eNOS protein levels without changes in protein expression of iNOS. These data might indicate that placental oxygenation levels are sufficient to escape to iNOS hypoxia-induced up-regulation or that the higher NO[•] production subsequent to the elevated eNOS expression maintains an adequate placental vasodilatation to support foetal oxygenation. Using pregnant mice subjected to severe systemic hypoxia, Schäffer et al. have obtained comparable results, i.e. an up-regulation of eNOS, but not iNOS, in the placental labyrinth and have demonstrated that this was associated with a preserved tissue perfusion, suggesting that NO[•] synthesis is an effective protective mechanism to maintain placental oxygenation during chronic hypoxia [30]. Also, in the rat placenta, VEGF expression has been shown to increase specifically in the labyrinth zone over the last week of gestation, and this change coincided with a marked elevation of the vascularisation in this zone [20]. This augmentation has been proposed as an expected change to enhance the efficiency of foetomaternal transport to support the greater demands of the foetus during late gestation [20]. From this point of view, the elevated eNOS protein expression found in growth-restricted placentas from our animal model compared to control ones, parallel to the increased placental labyrinth VEGF expression, further supports the hypothesis of placental hypoxia. However, increased NO[•] concentrations can be detrimental as NO[•] competes with SOD for the removal of O₂^{•-} by forming ONOO⁻, which has the potential to cause protein damages [8]. We showed in IUGR placentas that SOD and catalase activities as well as nitrotyrosine protein

abundance were similar to those observed in normal placentas in spite of the increased eNOS expression and the plausible NO[•] production. These data propose that NO[•] levels do not overwhelm placental SOD and that NO[•] is used to induce biological responses instead of generating NO-dependent oxidative cellular damages.

Apoptosis is necessary to the normal placental development through its participation in endovascular invasion and blood vessel remodelling [11]. However, an increase in trophoblast apoptosis was found in IUGR placentas in humans [31;32] and rats [33;34]. In the present IUGR model, we found heightened Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-X_L ratios, revealing that apoptosis is increased in growth-restricted placentas. This is supported by the higher p53 protein expression, possibly due to the slight decrease in its promoter methylation. It has been shown in human cultured trophoblasts that hypoxia enhances apoptosis through an increase in p53 and Bax expression and a lower expression of Bcl-2 [35]. Similarly, apoptosis was found to be higher in human placental villi from IUGR pregnancies in association with an increased expression of p53 without changes in levels of members of the Bcl-2 family [36]. Thus, placentas in our IUGR model exhibit more apoptosis and this could be related to hypoxia. Moreover, this increased apoptosis might be associated with the reduction in placental mass which could contribute to foetal IUGR.

During late gestation, hypoxia induces profound changes in the normal distribution of foetal blood flow in order to preserve O₂ requirements for essential organs, such as the brain, the heart and the adrenals; this phenomenon is called the brain-sparing effect [37]. In the IUGR model, previous works suggest that uteroplacental perfusion is impaired [14;15;38]. In cases of uterine blood flow reductions, renal blood flow is diminished and O₂ delivery declines [37], indicating that foetal kidneys are susceptible to hypoxia. Thus, in order to investigate the presence of foetal hypoxia, we have looked to VEGF expression in foetal kidneys. Results indicate that kidneys from IUGR foetuses are unlikely to be hypoxic and suggest that reduced O₂ levels found in placentas is not sufficient to compromise foetal O₂ supply to the kidneys. However, microarray analysis performed on foetal adrenals revealed that IUGR foetuses are subjected to hypoxia with an upregulation of a number of direct hypoxia target genes (unpublished observations). These results also point out that renal VEGF expression might not be a good hypoxic marker in this precise context.

In summary, our data indicate that reduced placental and foetal growth observed in this animal model induced by a maternal low-sodium diet over the last week of gestation might be mediated, at least in part, through placental hypoxia and apoptosis. These events are accompanied by a redistribution of blood flow in IUGR fetuses, causing fetal hypoxia. Longitudinal studies will be undertaken to determine the primary events that lead to this placental and foetal growth restriction.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (MOP-37902). Personal support was provided by NSERC and Fonds de la Recherche en Santé du Québec to K.B. (studentships).

REFERENCES

- [1] Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 150-157.
- [2] Huppertz B, Peeters LL. Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis* 2005; 8: 157-167.
- [3] Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, Kimura A, Minekawa R, Tahara M, Tasaka K, Murata Y. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol* 2004; 183: 145-154.
- [4] Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 1995; 182: 1683-1693.
- [5] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-4613.
- [6] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 227-241.
- [7] Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 743-746.
- [8] Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 55-99.
- [9] Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006; 91: 807-819.
- [10] Greijer AE, van der WE. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1009-1014.
- [11] Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev* 2005; 26: 877-897.
- [12] Caluwaerts S, Vercruysse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* 2005; 26: 574-584.
- [13] Vercruysse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 2006; 27: 22-33.

- [14] Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 608-613.
- [15] St-Louis J, Sicotte B, Beausejour A, Brochu M. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 2006; 131: 331-339.
- [16] Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdes G, Donoso E. Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 1029-1033.
- [17] Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Menheere PP, Schouten HJ, Peeters LL. Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 361-367.
- [18] Pogribny IP, Pogribna M, Christman JK, James SJ. Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible in vivo relevance during tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 588-594.
- [19] Beausejour A, Houde V, Bibeau K, Gaudet R, St-Louis J, Brochu M. Renal and cardiac oxidative/nitrosative stress in salt-loaded pregnant rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007.
- [20] Hewitt DP, Mark PJ, Waddell BJ. Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology* 2006; 147: 5568-5574.
- [21] Roh CR, Budhreja V, Kim HS, Nelson DM, Sadovsky Y. Microarray-based identification of differentially expressed genes in hypoxic term human trophoblasts and in placental villi of pregnancies with growth restricted fetuses. *Placenta* 2005; 26: 319-328.
- [22] Tse JY, Lao TT, Chan CC, Chiu PM, Cheung AN. Expression of vascular endothelial growth factor in third-trimester placentas is not increased in growth-restricted fetuses. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8: 77-82.
- [23] Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JC, Greer IA. Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta* 1997; 18: 269-276.
- [24] Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 127-139.
- [25] Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
- [26] Kalhan S, Parimi P. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* 2000; 24: 94-106.

- [27] Shin BC, Fujikura K, Suzuki T, Tanaka S, Takata K. Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: a possible machinery for the transplacental transfer of glucose. *Endocrinology* 1997; 138: 3997-4004.
- [28] Zamudio S, Baumann MU, Illsley NP. Effects of chronic hypoxia in vivo on the expression of human placental glucose transporters. *Placenta* 2006; 27: 49-55.
- [29] Vatish M, Randeve HS, Grammatopoulos DK. Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia. *Trends Mol Med* 2006; 12: 223-233.
- [30] Schaffer L, Vogel J, Breymann C, Gassmann M, Marti HH. Preserved placental oxygenation and development during severe systemic hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R844-R851.
- [31] Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1395-1401.
- [32] Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 158-166.
- [33] Ain R, Canham LN, Soares MJ. Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *J Endocrinol* 2005; 185: 253-263.
- [34] Chauhan M, Yallampalli U, Reed L, Yallampalli C. Adrenomedullin 2 antagonist infusion to rats during midgestation causes fetoplacental growth restriction through apoptosis. *Biol Reprod* 2006; 75: 940-947.
- [35] Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM. Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C982-C988.
- [36] Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 1056-1061.
- [37] Jensen A, Gamier Y, Berger R. Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 84: 155-172.
- [38] Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E124-E131.

Figure legends

Figure 1: VEGF and VEGFRs expression in day 22 control (open bars) and IUGR (hatched bars) placentas. Respectively, 6 and 10 dams per group were used to evaluate expression of VEGF mRNA (A) and protein (B). Immunodetection of VEGF (C) was performed on paraffin-embedded sections of rat placentas that were processed for immunohistochemistry labelling as described in Materials and Methods. Images were taken with a 10X objective and are shown as representative illustrations of 9 control and 11 IUGR placentas. Semi-quantitative analyses were done on VEGF immunodetection (D). mRNA expression of both VEGFRs (E) was determined using 6 animals per group. The results are expressed as means \pm SE. IUGR group significantly different from control animals are indicated by * P <0.05 and ** P <0.01. *BZ*, basal zone and *LB*, labyrinth zone.

Figure 2: Expression of eNOS and iNOS protein in day 22 control (open bars) and IUGR (hatched bars) placentas. Representative immunoblots for eNOS and iNOS and corresponding densitometric analyses are shown. Human endothelial cell lysate (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) for eNOS and mouse macrophage + INF γ /LPS cell lysate for iNOS (BD Biosciences) serve as positive controls. Densitometric data represent means \pm SE from 6 dams per group. IUGR group significantly different from control animals are indicated by * P <0.05.

Figure 3: Expression of GLUT1 and GLUT3 mRNA (A) and protein (B) in day 22 control (open bars) and IUGR (hatched bars) placentas. Representative immunoblots are shown and data from densitometric analyses are expressed in arbitrary units relative to β -actin for GLUT1 and GLUT3 (B). H4 cell lysate (Santa Cruz Biotechnology Inc.) for GLUT1 and rat brain lysate for GLUT3 serve as positive controls. Bax/Bcl-2 ratio (C) is represented using arbitrary units from densitometric analyses. The results are expressed as means \pm SE from 12 dams per group. IUGR group significantly different from control animals are indicated by * P <0.05.

Figure 4: Levels of the pro-apoptotic protein Bax (A) and the anti-apoptotic proteins Bcl-2 (B) and Bcl-X_L (C) as well as the resulting apoptotic indexes of Bax/Bcl-2 (D) and Bax/Bcl-X_L (E) in day 22 control (open bars) and IUGR (hatched bars) placentas. Representative immunoblots are shown and data from densitometric analyses are expressed in arbitrary units relative to β -actin for Bax (A), Bcl-2 (B) and Bcl-X_L (C). Rat thymus lysate serves as positive control.

Bax/Bcl-2 (D) and Bax/Bcl-X_L (E) ratios are represented using arbitrary units from densitometric analyses. The results are expressed as means \pm SE from 6 dams per group. IUGR group significantly different from control animals are indicated by $*P<0.05$.

Figure 5: Methylation of the p53 promoter at the HinPI I, Aci I, BstU I sites (A) and p53 protein expression (B) in day 22 control (open bars) and IUGR (hatched bars) placentas. Representative immunoblot is shown and data from densitometric analyses are expressed in arbitrary units relative to β -actin. A431 (Human epithelial carcinoma cell line) whole cell lysate serves as positive control. Results are expressed as means \pm SE from 6 dams per group. IUGR group significantly different from control animals are indicated by $*P<0.05$.

Figure 6: VEGF expression in the kidneys from day 22 control (open bars) and IUGR (solid bars) fetuses. Respectively, 6 and 10 litters per group were used to evaluate expression of VEGF mRNA (A) and protein (B). Immunodetection of VEGF (C) was performed on paraffin-embedded sections of fetal rat kidneys that were processed for immunohistochemistry labelling as described in Material and Methods. Images were taken with a 2X objective and are shown as representative illustrations of 12 complete fetal kidneys from 3 different litters per group. Semi-quantitative analyses were done on VEGF immunodetection (D). The results are expressed as means \pm SE. IUGR groups significantly different from control animals are indicated by $*P<0.05$.

Figure 7: Fetal kidney levels of the pro-apoptotic protein Bax (A) and the anti-apoptotic protein Bcl-2 (B) and the resulting apoptotic index (C) in day 22 control (open bars) and IUGR (solid bars) fetuses. Representative immunoblots are shown and data from densitometric analyses are expressed in arbitrary units relative to β -actin for Bax (A) and Bcl-2 (B). Rat thymus lysate serves as positive control. Bax/Bcl-2 ratio (C) is represented using arbitrary units from densitometric analyses. Data for all densitometric analyses depicted represent means \pm SE from 6 litters per group.

Table 1. PCR primers designed (by alpha DNA) for genes of interest

Gene - gene number FP: Forward Primer (5'→3') RP: Reverse Primer (5'→3')	Product size (bp)	Tissue	Optimal conditions	
			Temperature (°C)	Cycle (number)
For p53 promoter methylation status:				
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) - NM_017008				
FP: TACCAGGGCTGCCITCTCT RP: GAAGATGGTGTATGGGTTTCC	178	Placenta	54	22
p53 - m26863, primers from Prognobny <i>et al.</i>				
FP: GTTTCAAAAAGCCAAAAAGA RP: GCAAGGAAAGTCCCAATG	418	Placenta	54	28
For gene expression :				
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) - NM_017008				
FP: GGTGATGCTGGTGTCTGAGTA RP: GGATGCAGGGATGATGTCT	369	Placenta Kidney	57 56	20 22
Vascular endothelial growth factor (VEGF) - NM_031836				
FP: TGCACCCACGACAGAAGGGGA RP: TCACCGCCTTGGCTTGTACAT	4 variants: 564, 492, 432 and 360	Placenta Kidney	67 62	27 30
Vascular endothelial growth factor receptor type 1 (VEGFR1) - NM_019306				
FP: GAGATTCTCCGTGGTCAAA RP: CGATGCTTACGCTGATAAA	297	Placenta	59	26
Vascular endothelial growth factor receptor type 2 (VEGFR2) - NM_013062				
FP: AAGGACCTCAGACGCAAGAA RP: CATCCCAACACAAAAGCAC	259	Placenta	59	26
Facilitated glucose transporter type 1 (GLUT1) - NM_138827				
FP: ACCCACTCACCACACTCTG RP: GCCACAGTACACTCCAATGA	228	Placenta	59	22
Facilitated glucose transporter type 3 (GLUT3) - NM_017102				
FP: CTCAGGTCTTTGGTTTGGAC RP: GGAGACTTGAAGAGCTCCAG	286	Placenta	59	24

Figure 1.

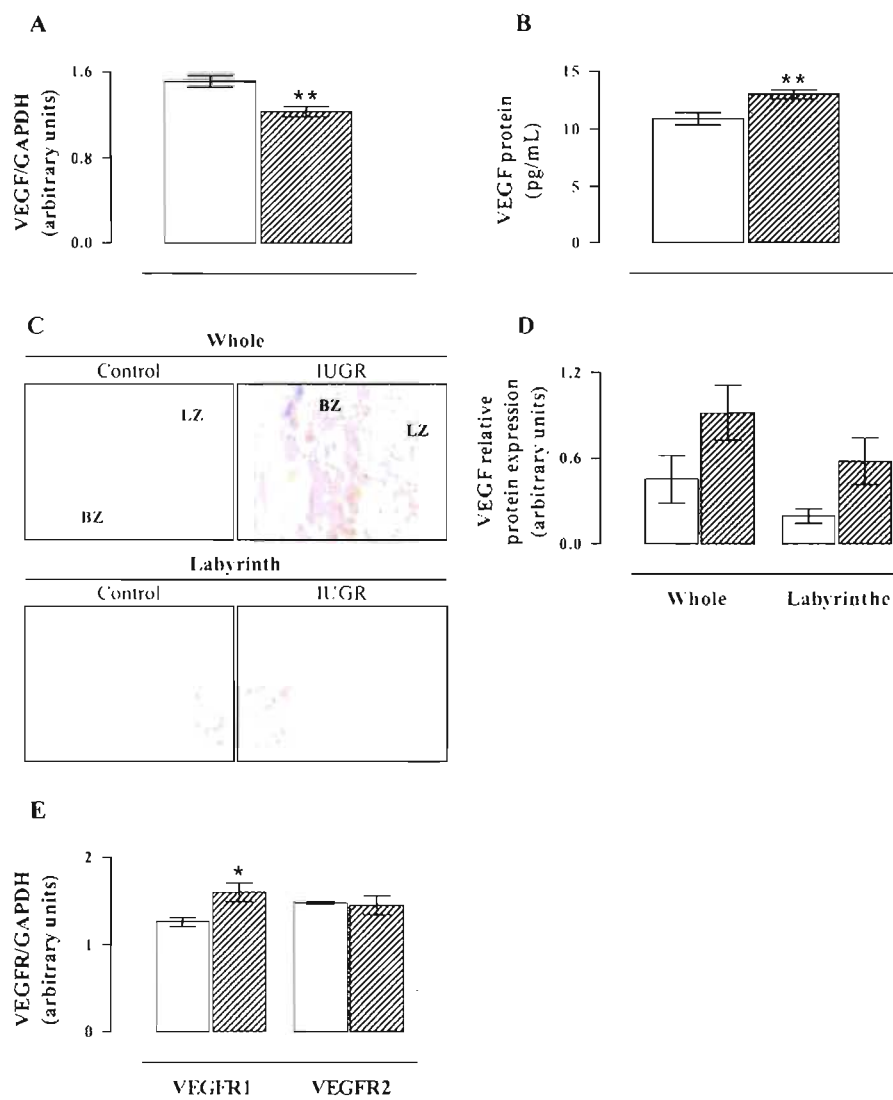


Figure 2.

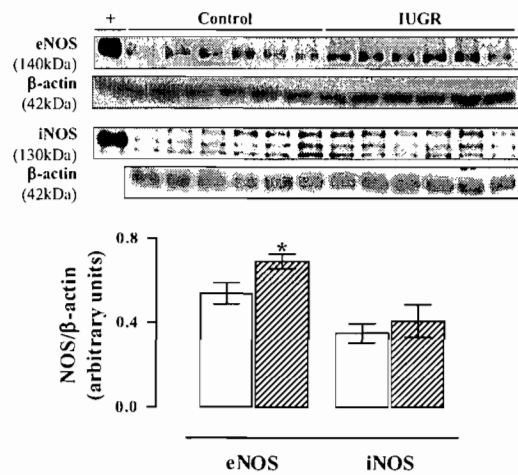


Figure 3.

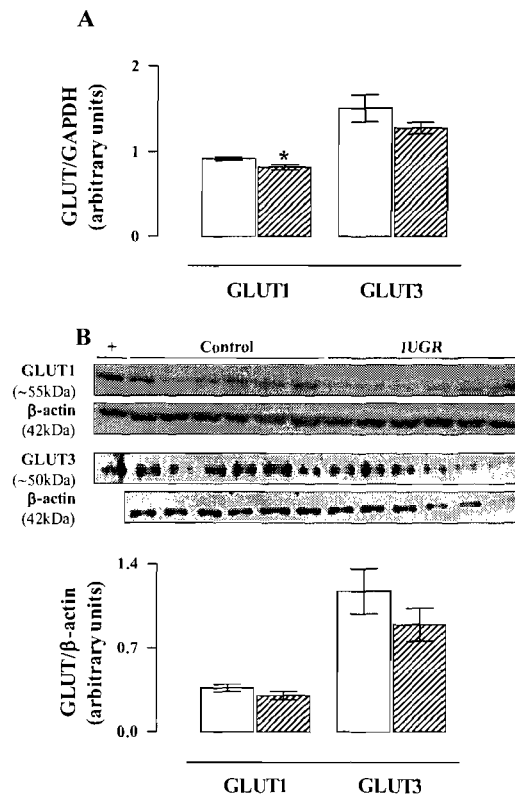


Figure 4.

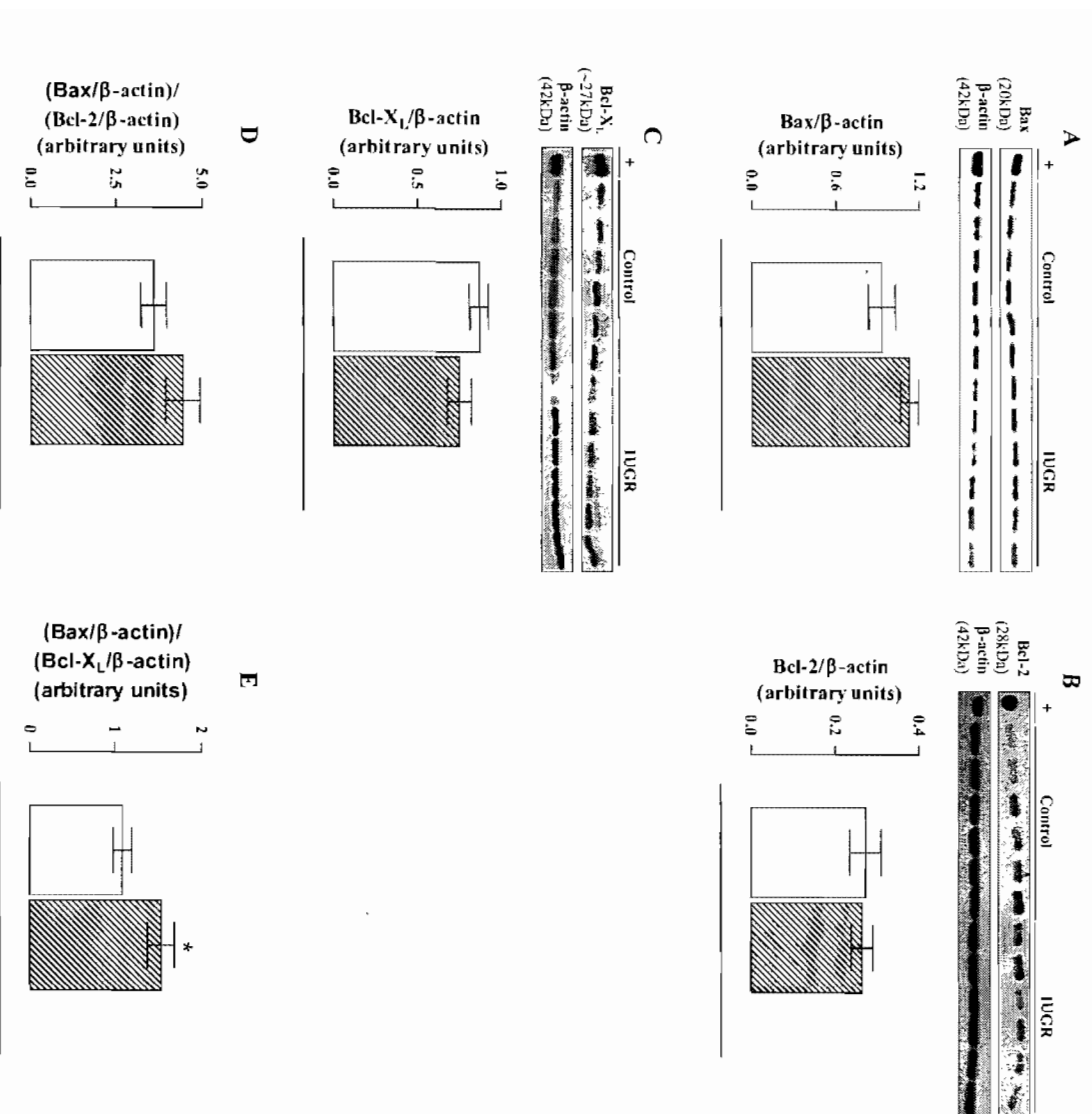


Figure 5.

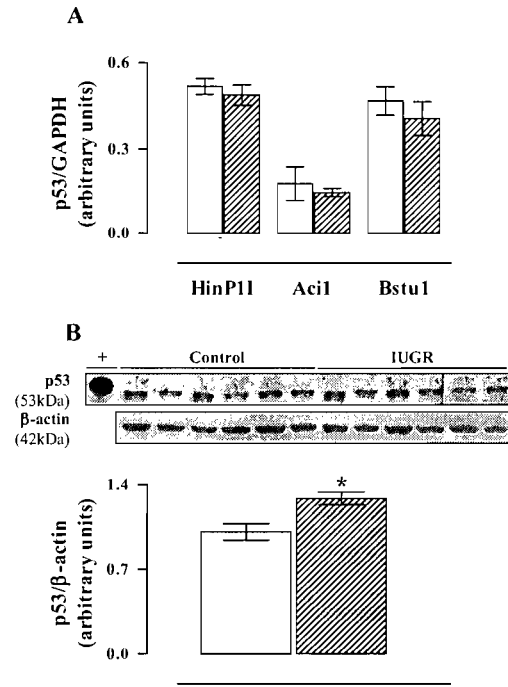


Figure 6.

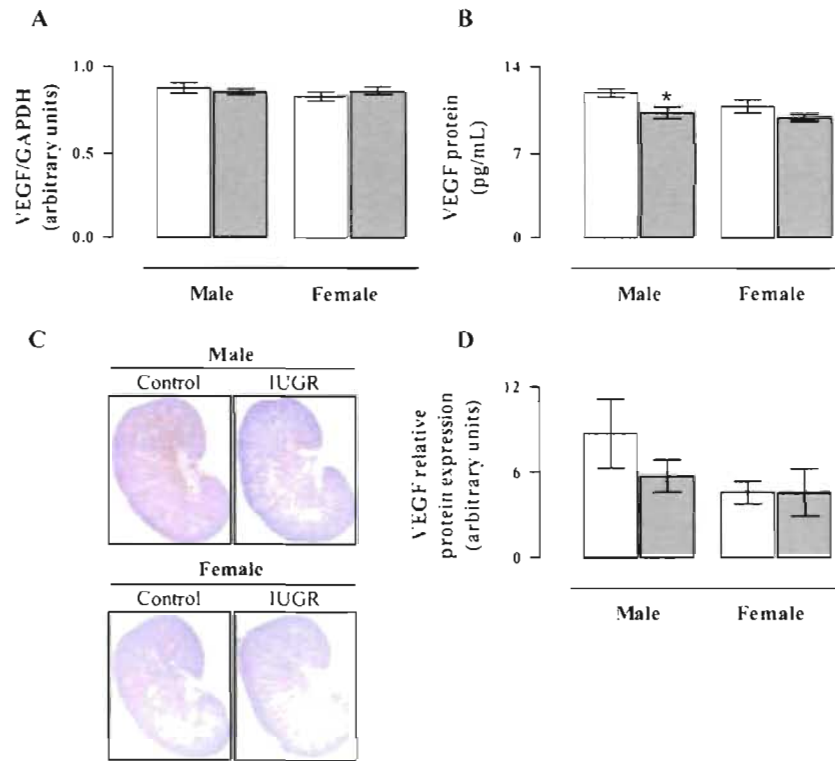
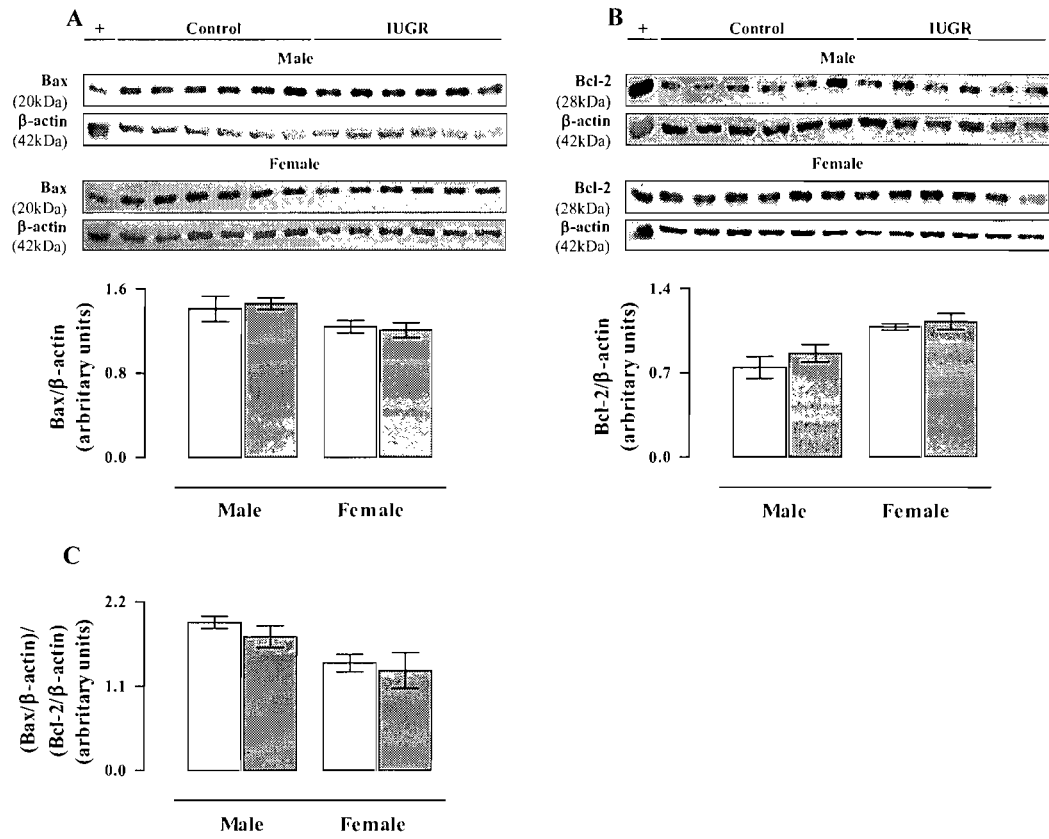


Figure 7.



CHAPITRE 3. MANUSCRIT 2

**REDUCED FETAL GLUCOCORTICOIDS IN A RAT MODEL OF FETAL PROGRAMMING
OF ADULT DISEASES**

TITRE, AUTEURS, SOUMISSION ET CONTRIBUTION DU MANUSCRIT 2

Titre. Reduced fetal glucocorticoids in a rat model of fetal programming of adult diseases

Auteurs. Karine Bibeau, Audrayanne Desjardins et Michèle Brochu

Soumission. Soumis dans *Life Sciences* le 27 septembre 2007

Contribution. Avec l'aide et l'appui du Dre Michèle Brochu, j'ai construit ce projet et planifié les manipulations. Madame Audrayanne Desjardins a fourni une participation technique à cet article en produisant les expériences sur l'expression protéique de la 11 β HSD2. Tous les autres résultats proviennent d'expériences que j'ai personnellement faites. J'ai par la suite rédigé l'article, avec les conseils et sous la supervision du Dre Michèle Brochu.

PREUVE DE SOUMISSION DU MANUSCRIT 2

De : Life Sciences [mailto:lifesci@elsevier.com]

Envoyé : 27 septembre 2007 16:05

À : [REDACTED]

Objet : Submission Confirmation

Dear Dr. Brochu,

Your submission entitled "Reduced fetal glucocorticoids in a rat model of fetal programming of adult diseases" has been received by Life Sciences. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU MANUSCRIT 2

Réduction des glucocorticoïdes fœtaux dans un modèle de rat de programmation fœtale des maladies de l'adulte

Les glucocorticoïdes pendant la période périnatale sont impliqués dans le développement et la maturation des organes et des systèmes biologiques. Dans la circulation fœtale, les glucocorticoïdes proviennent du transfert maternel et de la synthèse par les surrénales fœtales par le cytochrome P450 11 β -hydroxylase (P45011 β). La 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β HSD2) placentaire catalyse la conversion des glucocorticoïdes actifs en leurs produits inertes. En donnant une diète faible en sodium à des rates pour la dernière semaine de gestation, les fœtus naissent avec une restriction de croissance intra-utérine (RCIU) et développent à l'âge adulte une pression artérielle élevée et une dysfonction rénale. Le but du présent rapport était d'étudier la contribution de la 11 β HSD2 placentaire et du P45011 β surrénalien aux concentrations sériques de glucocorticoïdes chez ces fœtus RCIU. Des rates témoins et expérimentales ont été sacrifiées au jour 22 (terme=23 jours). Les niveaux sériques de corticostérone ont été mesurés par radioimmunoessai. L'expression génique et protéique de la 11 β HSD2 placentaire et du P45011 β surrénalien ont été évaluées par transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne semi-quantitative et immunobuvardage de type Western, respectivement. Les niveaux maternels de corticostérone et l'expression placentaire de la 11 β HSD2 n'étaient pas différents entre les 2 groupes. Les concentrations sériques de corticostérone étaient inférieures chez les fœtus RCIU. L'expression protéique du P45011 β surrénalien était réduite chez les fœtus RCIU sans diminution significative des niveaux d'ARNm. La réduction des niveaux de corticostérone indique que la stéroïdogénèse surrénalienne est modifiée chez les fœtus RCIU. Ceci pourrait être lié à un défaut dans la maturation des systèmes biologiques fœtaux menant au phénotype observé à l'âge adulte.

Mots-clés : placenta, 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2, surrénale, cytochrome P450 11 β -hydroxylase

MANUSCRIT 2

Reduced fetal glucocorticoids in a rat model of fetal programming of adult diseases

Karine Bibeau, Audrayanne Desjardins and Michèle Brochu*

Research Centre, CHU Sainte-Justine, and Department of Obstetrics and Gynaecology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

***Correspondence and address for reprint requests:**

Michèle Brochu, Ph.D.

CHU Sainte-Justine Centre de recherche

3175 Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada

H3T 1C5

E-mail 

Tel: (514) 345-4931 ext. 5035

Fax: (514) 345-4801

ABSTRACT

Glucocorticoids during the perinatal period are implicated in the development and maturation of organs and biological systems. In the fetal circulation, glucocorticoids come from maternal transfer and from synthesis by the fetal adrenal glands via cytochrome P450 11 β -hydroxylase (P45011 β). Placental enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2) catalyses the conversion of active glucocorticoids into their inert products. By giving a low-sodium diet to rats for the last week of gestation, pups were born with IUGR and developed high blood pressure and renal dysfunction as adults. The aim of the present report was to investigate the contribution of placental 11 β HSD2 and of fetal adrenal P45011 β in fetal serum glucocorticoid levels in these IUGR animals. Experimental and control dams were sacrificed on day 22 (term=23 days). Serum corticosterone levels were measured by radioimmunoassay. Placental 11 β HSD2 and fetal adrenal P45011 β gene and protein expression were evaluated by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and Western blotting. Maternal corticosterone levels and placental 11 β HSD2 expression were not different between the 2 groups. Serum corticosterone concentrations were lower in IUGR fetuses. Adrenal P45011 β protein expression was reduced in the IUGR fetuses without significant decrease of mRNA levels. The lowered corticosterone levels revealed altered adrenal steroidogenesis in the IUGR group. This could be related to a defect in fetal biological systems maturation leading to the phenotype seen in adulthood.

Key words: placenta, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, adrenal, cytochrome P450 11 β -hydroxylase

INTRODUCTION

Epidemiological studies indicate that low birthweight at term is a risk factor for the development of several diseases during adult life, including cardiovascular diseases, type 2 diabetes and their predisposing conditions: dyslipidemia, impaired glucose tolerance, vascular endothelial dysfunction and hypertension (McMillen and Robinson, 2005). This association between intrauterine growth restriction (IUGR) and adult chronic diseases led to the hypothesis of the developmental origin of adult diseases, which proposes that unfavorable environmental factors, particularly nutrition, during fetal life increase risks for the early onset of cardiovascular and metabolic diseases in adult life (Barker et al., 1989). Further evidence supporting the hypothesis was provided by animal studies, in which the fetal environment was manipulated through altered maternal dietary intake or modification of uterine artery blood flow (Bertram and Hanson, 2001). These works suggested that poor nutrition and oxygenation during intrauterine life are the primary factors implicated in the programming of adult diseases (Murphy et al., 2006). However, some hormones have also been investigated as programming signals (Murphy et al., 2006).

Glucocorticoids produced by the adrenal cortex zona fasciculata via cytochrome P450 11 β -hydroxylase (P45011 β) are required for the development and maturation of fetal organs and biological systems in view of the extrauterine survival. Moreover, observations in humans and sheep indicate that they play a role in labor initiation (Murphy et al., 2006). This reveals the importance of these steroids in fetal life. Nevertheless, it has been shown that increased fetal glucocorticoid exposure through elevated maternal glucocorticoid levels is associated with growth inhibition (Murphy et al., 2006) and the subsequent development of adverse adult cardiovascular, metabolic, neuroendocrine and behavioral phenotypes (Seckl, 2004). However, it has also been shown that a low fetal corticosterone environment is associated with long-term health effects (Lesage et al., 2004; Blondeau et al., 2001). In fact, it has been demonstrated that the development of pancreatic insulin-producing β -cells is sensitive to glucocorticoids (Blondeau et al., 2001), with glucocorticoid underexposure promoting the size of β -cell islets while overexposure having the opposite effect, decreasing β -cell mass. The glucose intolerance observed in adulthood after IUGR can thus result from glucocorticoid-induced alterations in fetal β -cell development (Lesage et al., 2004; Blondeau et al., 2001). Since excessive or diminished quantities might be detrimental, the fine-tuned regulation of fetal glucocorticoids is essential.

During gestation, circulating fetal glucocorticoid (cortisol in humans, corticosterone in rats) levels are low compared to maternal concentrations. This difference is maintained by the presence of a placental enzyme, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2), which catalyzes the conversion of active glucocorticoids into inert 11-keto products (Waddell et al., 1998). Therefore, 11 β HSD2 is a key step limiting fetal exposure to high concentrations of endogenous maternal glucocorticoids, even though the barrier is apparently incomplete, as a proportion of maternal glucocorticoids (10-20%) crosses intact into the fetus (Seckl, 2004). By late gestation, the rat fetal adrenal cortex matures under the trophic influence of adrenocorticotropin (ACTH) (Chatelain et al., 1980) and becomes the primary source of glucocorticoids in the fetus (Arishima et al., 1977). However, it has been shown that placental 11 β HSD2 activity is reduced during late gestation in humans (Murphy et al., 2006) and rats (Waddell et al., 1998), suggesting that an increasing proportion of glucocorticoids might be of maternal origin. Therefore, regulation of 11 β HSD2 activity is extremely important for adequate fetus development and maturation.

We have reported (Roy-Clavel et al., 1999) that giving a low-sodium diet to female rats for the last week of gestation induces the birth of IUGR pups. The reduction of maternal circulating volume expansion, accompanied by decreased uterine arcuate artery diameter and placental weight compared to pregnant rats on a normal diet, indicates poor placental perfusion (Roy-Clavel et al., 1999; St-Louis et al., 2006). Diminished plasma volume expansion is observed in women with idiopathic IUGR (Rosso et al., 1993; Salas et al., 1993; Duvetkot et al., 1995), making our IUGR model relevant to the human condition. As adults, these IUGR animals develop higher systolic blood pressure (Battista et al., 2002) and present renin-angiotensin-aldosterone system alterations (Battista et al., 2002), renal dysfunction (Battista et al., 2002), hypertrophic cardiac remodelling (Battista et al., 2005) and altered response to salt (Bibeau et al., unpublished results), all of which represent risk factors for the onset of cardiovascular diseases. Using our model for the study of fetal programming, we postulated that a defect of fetal glucocorticoid levels could be involved in the alterations encountered in adult life. Thus, the aim of the present report was to investigate the contribution of placental 11 β HSD2 and of fetal adrenal P45011 β in fetal serum glucocorticoid levels.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This study was approved by the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec, Canada) weighing 225-250 g were mated with a known fertile male. Day 1 of pregnancy was determined by the presence of spermatozoa in morning vaginal smears. All animals were housed under controlled illumination on a 12h light-dark cycle under ambient temperature ($21 \pm 3^\circ\text{C}$). The dams were randomly assigned to 1 of 2 diets for the last 7 days of gestation (term=day 23). One group was fed a normal diet containing 0.2% sodium (normal diet 5755; PMI Feed Inc., Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and tap water. Their fetuses comprised the control group. The second group received a 0.03% sodium diet (low-sodium diet 5882; PMI Feed Inc.) and demineralized water. Their fetuses suffered from IUGR (IUGR *vs* control: male: 4.7 ± 0.5 g *vs* 5.2 ± 0.5 g, $P < 0.001$ and female: 4.4 ± 0.5 g *vs* 4.9 ± 0.4 g, $P < 0.001$) as previously shown (Battista et al., 2002). On day 22 of gestation, the animals were sacrificed by decapitation (8AM-9AM). Rapidly, trunk blood from the mothers as well as from their male and female fetuses was collected in plain tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged at 1,550 g for 20 min at 4°C . Serum samples were then stored at -80°C until their use. Placentas and sex-separated fetal adrenals were quickly removed and snap frozen in liquid nitrogen.

Serum corticosterone

Corticosterone was measured directly from serum with commercial radioimmunoassay kits (Medicorp, Montréal, Québec, Canada).

RNA isolation

Total cellular RNA from frozen placentas (3-4 placentas/rat) or fetal adrenals (sex-pooled adrenals from 1-2 litters) was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada) as described elsewhere (Battista et al., 2005). Final RNA pellets were dissolved in an appropriate volume of diethylpyrocarbonate (DEPC) water and stored at -80°C . RNA concentration was measured by absorbance at a wavelength of 260 nm, the integrity of the samples was evaluated by 260/280 nm ratio, and quality was verified by ethidium bromide fluorescence.

RT-PCR

PCR primers specific for genes of interest were designed with PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) according to sequence data from the National Center for Biotechnology Information (Table 1).

Single-stranded cDNA was created by RT (SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase, Invitrogen) and PCR (Taq DNA Polymerase, Invitrogen), employing the procedure detailed by the manufacturer. The annealing step was carried out for 1 min at temperatures determined for each gene in the placenta and fetal adrenals (Table 1). The extension step was performed at 72°C for 1 min. The PCR results were recorded during the exponential phase. The number of cycles needed for amplification was established for each gene in each tissue (Table 1). PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels and quantified by ethidium bromide fluorescence. Amplification products were quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). The procedure was performed on triplicate samples. The results were reported on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control.

11βHSD2 and P45011β protein expression

Frozen placentas (3-4 placentas/rat) or fetal adrenals (sex-pooled adrenals from 1-2 litters) were homogenized in lysis buffer (1:4 w/v) containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate and 1X complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Indianapolis, IN), and centrifuged at 12,000 g for 30 min. Supernatants were collected and then resuspended in Laemmli buffer. For comparative purposes, equal amounts of protein (40 µg placenta/lane for 11βHSD2 and 25 µg adrenal/lane for P45011β) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (resolving: 15% for 11βHSD2 and 10% for P45011β; stacking: 5%) gel electrophoresis, then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Non specific sites on the membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% skim milk phosphate-buffered saline (1.4 M NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 17.6 mM KH₂PO₄, pH 7.4)/0.1% Tween 20. Overnight incubation at 4°C was undertaken with either sheep anti-11βHSD2 (1/1,000; Chemicon, Temecula, CA) or mouse anti-P45011β (1/1,000; Chemicon). The membranes were then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-sheep (1/5,000; Boehringer, Mannheim, West Germany) or anti-mouse IgG (1/5,000; Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) for 45 min at room temperature. Equal protein loading was determined on the same membrane with mouse

anti- β -actin primary antibody (1/100,000; Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO). Immunoreactive bands were visualized with the ECL Western blotting analysis system (GE HealthCare Biosciences Inc., Montréal, Québec, Canada). The bands were quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). The results are expressed as densitometric units relative to β -actin.

Statistical analysis.

All results are expressed as mean \pm SEM and compared by Student's t test. Statistical significance was assumed with values of $P < 0.05$.

RESULTS

Corticosterone levels

At term-pregnancy, serum corticosterone concentration was not different between sodium-restricted dams and their controls (Fig. 1A). In fetuses, serum corticosterone levels were decreased (Fig. 1B) in IUGR males ($P<0.05$) and females ($P<0.001$) compared to their controls.

Placental 11 β HSD2 gene and protein expression

11 β HSD2 mRNA levels (Fig. 2A) and protein expression (Fig. 2B) were similar in term-placentas from low-sodium and control dams.

Adrenal P45011 β gene and protein expression

P45011 β mRNA expression (Fig. 3A) was not different in adrenals from IUGR fetuses compared to their controls. However, as shown in Fig. 3B, P45011 β immunoreactive band intensity was slightly reduced in adrenal samples from IUGR male and female fetuses in comparison to the controls. P45011 β protein expression (when converted to arbitrary units by densitometric analyses) was decreased in the adrenals from IUGR compared to control fetuses (Fig. 3B), but the difference reached statistical significance only in males ($P<0.01$).

DISCUSSION

This study investigated the possibility that fetal glucocorticoids could be responsible for the induction of the cardiovascular and renal alterations in adult IUGR rats born from mothers receiving a low-sodium diet during the last week of gestation. We found decreased expression of the fetal adrenal enzyme P45011 β leading to reduced circulating corticosterone concentrations at day 22 in IUGR fetuses without significant differences in maternal corticosterone levels and in placental 11 β HSD2 expression.

Glucocorticoids are thought to play a role in the developmental origins of adult diseases. Adverse, long-lasting health consequences of fetal glucocorticoid excess in adulthood, namely hypertension, hyperglycemia, hyperinsulinemia and altered behavior have been demonstrated (Seckl, 2004) in different animal models and procedures, such as maternal synthetic glucocorticoid treatment (Benediktsson et al., 1993), 11 β HSD2 inhibitor administration (Lindsay et al., 1996) and maternal stress (Lesage et al., 2004). In these studies, however, the fetal glucocorticoid environment was directly manipulated. Nevertheless, similar findings were reported in IUGR animal models induced by maternal low-protein diet (Langley-Evans et al., 1996) or undernutrition (Lesage et al., 2001). Placental 11 β HSD2 was reduced in these experiments. Recently, a key role of 11 β HSD2 in prenatal glucocorticoid programming was provided by knocking out fetoplacental 11 β HSD2, resulting in IUGR mice that exhibited greater anxiety as adults (Holmes et al., 2006). Our results of unchanged maternal corticosterone concentrations and placental 11 β HSD2 expression indicate that the IUGR in our model is not associated with increased fetal glucocorticoid exposure.

Interestingly, we observed decreased corticosterone levels in IUGR fetuses. In rats, adrenal development begins around embryonic day (E) 13 (Yamamoto et al., 2004), and adrenal maturation occurs in late gestation under the trophic influence of pituitary ACTH (Chatelain et al., 1980) as well as hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) (Boudouresque et al., 1988). Adrenal P45011 β expression is detectable as early as E16 (Wotus et al., 1998; Mitani et al., 1999), and corticosterone concentrations have been reported to peak in the adrenals around E18-E19 and in the plasma on E19 with a significant drop thereafter (Chatelain et al., 1980; Dupouy et al., 1975; Wotus et al., 1998). It is only around delivery that plasma corticosterone levels in fetal rats rise abruptly, originating mainly from the fetal adrenals (Arishima et al., 1977). Maturation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis occurs in late gestation, around E17 in rodent fetuses, ACTH and

corticosterone secretion being regulated by CRH (Boudouresque et al., 1988) and negative feedback regulation of the HPA axis being established by glucocorticoids (Reichardt and Schutz, 1996). The fetal HPA axis is thus sensitive to the glucocorticoid environment, and many studies have pointed to the detrimental long-term health effects, including hypertension and metabolic syndrome, of a disturbed fetal glucocorticoid environment on the HPA axis (Seckl, 2004; Murphy et al., 2006). However, factors other than fetal exposure to excess glucocorticoids are important in programming of the HPA axis. Indeed, it has been shown in sheep that maternal undernutrition in the absence of high maternal cortisol concentrations leads to premature maturation of the fetal HPA axis. It should be remained that in the present work, the IUGR pups were obtained by giving low-sodium diet to rats from E15 through E22. Knowing this, the decreased placental perfusion indicated by the reduction in maternal circulating volume, uterine arcuate artery diameter and placental weight in low-sodium pregnant rats (Roy-Clavel et al., 1999; St-Louis et al., 2006) might interfere with HPA axis development and maturation. Indeed, the reduced P45011 β expression and corticosterone concentrations seen in our IUGR fetuses reveal adrenal steroidogenesis alterations following adverse intrauterine conditions and, thus, might be related to the subsequent development of cardiovascular risk factors, as we have documented in other studies (Battista et al., 2002; Battista et al., 2005).

In conclusion, in our IUGR model induced by low-sodium diet during the last week of gestation, fetal adrenal steroidogenesis is altered without maternal glucocorticoid overexposure. This suggests that a defect of fetal adrenal development and maturation could be linked to the cardiovascular risk factors in adult life.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Personal support was provided by Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) to K.B. (studentship). We thank Mrs Sylvie Julien for her valuable assistance.

REFERENCES

- Arishima K., Nakama S., Morikawa Y., Hashimoto Y., Eguchi Y., 1977. Maternal-foetal interrelations of plasma corticosterone concentrations at the end of gestation in the rat. *The Journal of endocrinology* 72(2), 239-240.
- Barker D.J., Osmond C., Golding J., Kuh D., Wadsworth M.E., 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ (Clinical research ed.)* 298(6673), 564-567.
- Battista M.C., Calvo E., Chorvatova A., Comte B., Corbeil J., Brochu M., 2005. Intrauterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *The Journal of physiology* 565(1), 197-205.
- Battista M.C., Oligny L.L., St-Louis J., Brochu M., 2002. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283(1), E124-E131.
- Benediktsson R., Lindsay R.S., Noble J., Seckl J.R., Edwards C.R., 1993. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 341(8841), 339-341.
- Bertram C.E., Hanson M.A., 2001. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *British medical bulletin* 60, 103-121.
- Blondeau B., Lesage J., Czernichow P., Dupouy J.P., Breant B., 2001. Glucocorticoids impair fetal beta-cell development in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 281(3), E592-E599.
- Boudouresque F., Guillaume V., Grino M., Strbak V., Chautard T., Conte-Devolx B., Oliver C., 1988. Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses. *Neuroendocrinology* 48(4), 417-422.
- Chatelain A., Dupouy J.P., Allaume P., 1980. Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationships in the rat: effects of maternal adrenalectomy. *Endocrinology* 106(4), 1297-1303.
- Dupouy J.P., Coffigny H., Magre S., 1975. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *The Journal of endocrinology* 65(3), 347-352.
- Duvekot J.J., Cheriex E.C., Pieters F.A., Menheere P.P., Schouten H.J., Peeters L.L., 1995. Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstetrics and gynecology* 85(3), 361-367.
- Holmes M.C., Abrahamsen C.T., French K.L., Paterson J.M., Mullins J.J., Seckl J.R., 2006. The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for

direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *The Journal of neuroscience* 26(14), 3840-3844.

Langley-Evans S.C., Phillips G.J., Benediktsson R., Gardner D.S., Edwards C.R., Jackson A.A., Seckl J.R., 1996. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 17(2-3), 169-172.

Lesage J., Blondeau B., Grino M., Breant B., 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), 1692-1702.

Lesage J., Del-Favero F., Leonhardt M., Louvart H., Maccari S., Vieau D., Darnaudery M., 2004. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *The Journal of endocrinology* 181(2), 291-296.

Lindsay R.S., Lindsay R.M., Edwards C.R., Seckl J.R., 1996. Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension* 27(6), 1200-1204.

McMillen I.C., Robinson J.S., 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews* 85(2), 571-633.

Mitani F., Mukai K., Miyamoto H., Suematsu M., Ishimura Y., 1999. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology* 140(7), 3342-3353.

Murphy V.E., Smith R., Giles W.B., Clifton V.L., 2006. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocrine reviews* 27(2), 141-169.

Reichardt H.M., Schutz G., 1996. Feedback control of glucocorticoid production is established during fetal development. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2(6), 735-744.

Rosso P., Donoso E., Braun S., Espinoza R., Fernandez C., Salas S.P., 1993. Maternal hemodynamic adjustments in idiopathic fetal growth retardation. *Gynecologic and obstetric investigation* 35(3), 162-165.

Roy-Clavel E., Picard S., St-Louis J., Brochu M., 1999. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American journal of obstetrics and gynecology* 180(3 Pt 1), 608-613.

Salas S.P., Rosso P., Espinoza R., Robert J.A., Valdes G., Donoso E., 1993. Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstetrics and gynecology* 81(6), 1029-1033.

- Seckl J.R., 2004. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *European journal of endocrinology* 151 Suppl 3, U49-U62.
- St-Louis J., Sicotte B., Beausejour A., Brochu M., 2006. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 131(2), 331-339.
- Waddell B.J., Benediktsson R., Brown R.W., Seckl J.R., 1998. Tissue-specific messenger ribonucleic acid expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor within rat placenta suggests exquisite local control of glucocorticoid action. *Endocrinology* 139(4), 1517-1523.
- Wotus C., Levay-Young B.K., Rogers L.M., Gomez-Sanchez C.E., Engeland W.C., 1998. Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* 139(10), 4397-4403.
- Yamamoto M., Yanai R., Arishima K., 2004. Study of migration of neural crest cells to adrenal medulla by three-dimensional reconstruction. *The Journal of veterinary medical science* 66(6), 635-641.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Serum corticosterone levels in A) mothers and B) their fetuses on day 22 of gestation

The results are expressed as means \pm SEM from 15 dams or litters per group. Open bars represent control dams in (A) and control fetuses in (B), and solid bars represent low-sodium diet dams in (A) and IUGR fetuses in (B). Values significantly different from control animals are indicated by * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

Figure 2: 11 β HSD2 mRNA (A) and protein (B) expression in term-placentas from control rats (open bars) and dams of the IUGR model (solid bars)

Densitometric analyses of data are expressed in arbitrary units relative to GAPDH in (A) and to β -actin in (B). Rat kidney RNA (for RT-PCR) and rat kidney lysates (for Western blotting) serve as positive control. The data are means \pm SEM from 6 (for gene expression) or 12 (for protein expression) animals per group.

Figure 3: P45011 β mRNA (A) and protein (B) expression in fetal adrenals from IUGR rats (solid bars) and their controls (open bars)

Densitometric analyses of the data are expressed in arbitrary units relative to GAPDH in (A) and to β -actin in (B). The results are means \pm SEM from 6 litters per group. Values significantly different from control animals are indicated by ** $P < 0.01$.

Table 1. PCR primers designed (by alpha DNA) for genes of interest

Gene - gene number				
FP: Forward Primer (5'→3') RP: Reverse Primer (5'→3')	Product size (bp)	Tissue	Optimal conditions	
			Temperature (°C)	Cycle (number)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) - NM_017008				
FP: GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	369	Placenta	57	20
RP: GGATGCAGGGATGATGTTCT		Adrenal	55	20
11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11βHSD2) - NM_017081				
FP: GCCCTGGTGCTCTAGAACTG	184	Placenta	62	28
RP: AGTTCCACATCGGCCACTAC				
Cytochrome P450 11β-hydroxylase (P45011β) - XM_343262				
FP: TCATATCCGAGATGGTAGCA	399	Adrenal	54	20
RP: GCTCAGGTCTTGGGAACAC				

Figure 1.

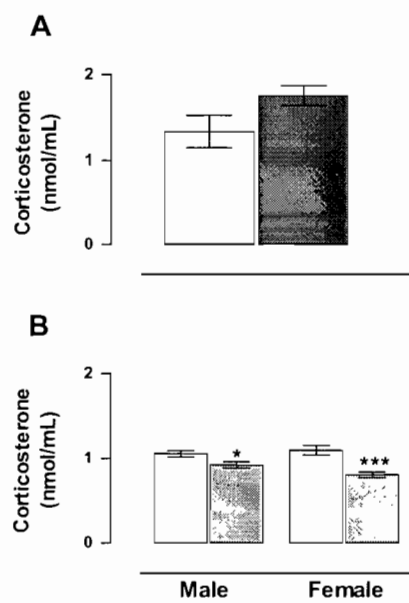


Figure 2.

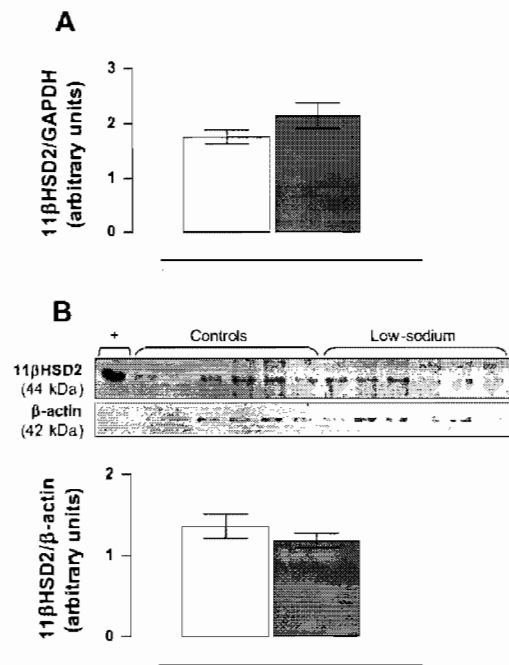
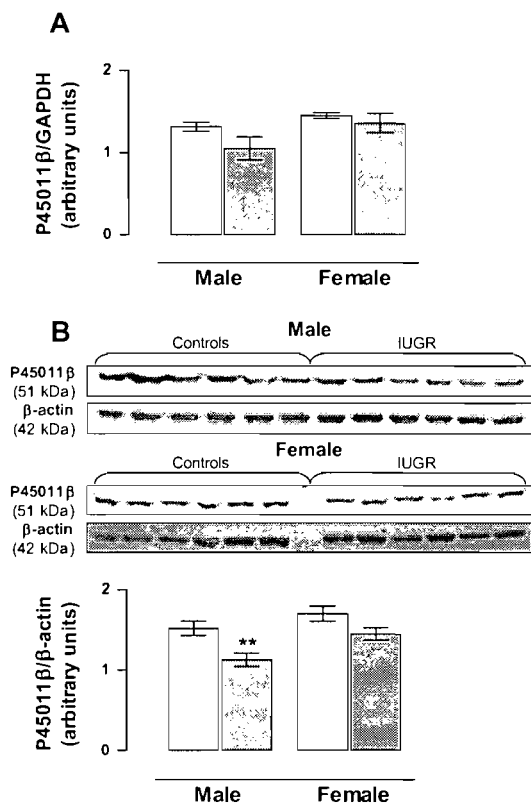


Figure 3.



CHAPITRE 4. MANUSCRIT 3

**ALTERED FETAL ADRENAL FUNCTIONS IN A RAT MODEL OF FETAL
PROGRAMMING OF ADULT DISEASES**

TITRE, AUTEURS, SOUMISSION ET CONTRIBUTION DU MANUSCRIT 3

Titre. Altered fetal adrenal functions in a rat model of fetal programming of adult diseases

Auteurs. Karine Bibeau et Michèle Brochu

Soumission. En préparation, soumission prochaine dans *Steroids*

Contribution. Avec l'aide et l'appui du Dre Michèle Brochu, j'ai construit ce projet et planifié les manipulations. Tous les résultats proviennent d'expériences que j'ai personnellement faites. J'ai par la suite rédigé l'article, avec les conseils et sous la supervision du Dre Michèle Brochu.

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU MANUSCRIT 3

Altérations des fonctions surrénaliennes fœtales dans un modèle de programmation fœtale des maladies de l'adulte chez le rat

En donnant une diète faible en sodium à des rates au cours du dernier tiers de gestation, nous avons développé un modèle animal de restriction de croissance intra-utérine (RCIU). À l'âge adulte, les animaux RCIU présentent une augmentation de la pression artérielle systolique, des altérations du système rénine-angiotensine-aldostérone, une dysfonction rénale et un remodelage cardiaque hypertrophique. Puisque le développement et la maturation de la surrénale fœtale surviennent en fin de la gestation chez le rat, l'objectif de la présente étude était d'évaluer l'expression de protéines et d'enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse et la synthèse des catécholamines dans les surrénales de fœtus RCIU. De plus, une analyse d'expression génique par microréseau a été faite pour examiner les mécanismes modifiés pouvant conduire au développement de facteurs de risque cardiovasculaires tels qu'observés chez ces animaux. L'augmentation sérique d'aldostérone chez les fœtus RCIU est associée à une augmentation des niveaux surrénaliens d'ARNm du récepteur de l'angiotensine II (AT) de type 1 et du cytochrome P450 aldostérone synthase. D'autre part, une diminution des concentrations sériques de corticostérone chez ces foetus peut s'expliquer par des altérations de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et de la stéroïdogénèse, lesquelles favorisent le stockage de cholestérol plutôt que la biosynthèse de corticostérone. L'augmentation de l'expression du récepteur AT₂ et la présence d'hypoxie suggérée par l'augmentation de l'ARNm du facteur de croissance vasculaire endothéliale et par le microréseau corrèlent avec l'induction des gènes des enzymes impliquées dans la synthèse des catécholamines. Ceci peut également être associé à la stimulation de gènes participant à la réponse inflammatoire aiguë. Toutes ces modifications pourraient entraîner des effets à long terme sur la santé, et donc, être impliquées dans la pathogenèse de l'augmentation de pression artérielle et du remodelage cardiaque hypertrophique observés chez les animaux RCIU adultes.

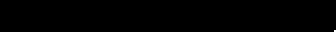
Mots-clés : programmation fœtale, modèle de rat, diète faible en sodium

MANUSCRIT 3

Altered adrenal steroidogenesis and catecholamine synthesis in intrauterine growth-restricted fetal rats**Short title:** Fetal adrenal and IUGR

Karine Bibeau and Michèle Brochu

Research Centre, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5 and Department of Obstetrics and Gynecology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3T7

Corresponding author: Michèle Brochu, Research Centre, CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5; Tel: (514) 345-4931 ext. 5035; Fax: (514) 345-4801; e-mail: **Grants:** Supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Personal support was provided by NSERC and Fonds de la Recherche en Santé du Québec to K.B. (studentships).

ABSTRACT

By giving a low-sodium diet to dams over the last third of gestation, we have developed an animal model of intrauterine growth restriction (IUGR). As adults, IUGR offspring were shown to manifest a significant increase in systolic blood pressure, renin-angiotensin-aldosterone system alterations, a renal dysfunction and a cardiac hypertrophic remodeling. Given that fetal adrenal development and maturation occur by late gestation in rats, the aim of the present study was to evaluate the expression of proteins and enzymes involved in steroidogenesis and catecholamine synthesis in adrenals from IUGR fetuses. Moreover, a gene microarray was done to screen for altered pathways that could lead to the development of cardiovascular risk factors observed in these animals. Increased aldosterone serum levels in IUGR fetuses was associated with an increased mRNA adrenal levels of angiotensin II receptor (AT) type 1 and cytochrome P450 aldosterone synthase. On the other hand, reduced serum corticosterone concentrations in these fetuses could be explained by alterations in gene expression involved in cholesterol metabolism and steroidogenesis, which promote cholesterol storage rather than corticosterone biosynthesis. The increased AT₂ receptor expression and the presence of hypoxia suggested by the increased vascular endothelial growth factor mRNA levels and by the microarray could explain the increased gene expression of the enzymes implicated in catecholamine synthesis. This might also be associated with the induction of genes involved in the inflammation-related acute-phase response. All of these modifications might have long-lasting health effects and thus, could be implicated in the pathogenesis of high blood pressure and cardiac hypertrophy observed in these IUGR adult animals.

Key terms: fetal programming, rat model, low sodium diet

INTRODUCTION

The rat adrenal glands are composed of two tissues with distinct embryological origin, namely the cortex and medulla. The adrenal medulla consists of catecholamine-producing chromaffin cells derived from the neuroectoderm, whereas cortical cells are mesodermally derived and produce steroid hormones. Around embryonic day (E) 13, the adrenal cortex primordium appears within the urogenital ridges (21) while medullary cells begin to migrate from the neural crest into the primordium (40). As early as E16, both zona glomerulosa (ZG) and zona fasciculata/reticularis (ZFR) cell phenotypes are present in the adrenal glands as confirmed by the expression of aldosterone synthase (P450aldo) and 11 β -hydroxylase (P45011 β) cytochrome P450, respectively (39). Moreover, aldosterone and corticosterone has been measured in the tissue (39) suggesting the steroidogenic activity of the fetal gland. Receptors of the main regulators of steroidogenesis, angiotensin II (AII) receptor subtypes (AT₁ and AT₂) (31; 32) and melanocortin type 2 receptor (7), are also expressed. However, the adult-like zonation in the adrenal cortex only appears at around the time of birth (17). Expression of tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting step in catecholamine synthesis, is already detectable in the medullary cell precursors found in the neural crest (37), but the capacity to synthesize epinephrine is only acquired by E16-E18 with the appearance of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) (29). Even if the conversion of the medullary cell precursors into chromaffin cells occurs before birth (40), some TH positive cells within the adrenal cortex are still present until the first days of postnatal life, indicating a late maturation of the adrenal medulla (17). The morphologic and functional relative immaturity of rat adrenals during late gestation might render these glands more sensitive to adverse intrauterine environmental conditions, which could alter the processes of development and maturation.

It has been shown in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR) induced by prenatal hypoxia that there is a delay in the maturation of the adrenal medulla that persist from the end of gestation until the first 2 weeks of postnatal life, and even into adulthood (15). Placental restriction in sheep results in IUGR fetuses that present an increased relative adrenal growth associated with higher circulating fetal cortisol levels (22) probably due to the enhanced cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 as suggested by an increase of its mRNA (24). Adrenal functions can though be programmed by the intrauterine environment.

We have reported (25) that giving a low-sodium diet to female rats for the last week of gestation induces the birth of IUGR pups. The reduction of maternal circulating volume expansion (25), accompanied by decreased uterine arcuate artery diameter (33) and placental weight (25) compared to pregnant rats on a normal diet, indicates poor placental perfusion which could be involved in the IUGR seen in our model. Diminished plasma volume expansion is observed in women with idiopathic IUGR (8; 27), making our model relevant to the human condition. Epidemiological and animal studies indicate that low birthweight at term is a risk factor for the development of several diseases during adult life, including cardiovascular diseases, type 2 diabetes and their predisposing conditions: dyslipidemia, glucose intolerance, vascular endothelial dysfunction and hypertension (16). This association between IUGR and adult chronic diseases led to the hypothesis of the developmental origin of adult diseases, which proposes that unfavorable environmental factors, particularly nutrition, during fetal life increase risks for the early onset of cardiovascular and metabolic diseases in adult life (2). In our model, IUGR animals develop, as adults, higher systolic blood pressure (4) and present renin-angiotensin-aldosterone system alterations (4), renal dysfunction (4), hypertrophic cardiac remodeling (3) and altered response to salt (Bibeau *et al.*, unpublished observations), all of which represent risk factors for the onset of cardiovascular diseases. Moreover, these phenotypes are related to sex since females of our model are more susceptible to the long-term adverse consequences of IUGR than males (4); (Bibeau *et al.*, unpublished observations). These results support the link between IUGR and the development of adult diseases, confirming our model as a good paradigm for the study of fetal programming. In this model, the adverse environment is induced from E15 until term, corresponding to the development and maturation of the adrenals. Thus, the aims of the present report were first to evaluate the expression of proteins and enzymes that are involved in adrenal steroidogenesis and catecholamine synthesis, then to investigate the presence of hypoxia and cellular apoptosis. To better characterize the results obtained for the first two aims, a screening for genes that are differentially expressed in adrenals from IUGR fetuses and their controls was done using microarray analysis. This could lead to identify pathways that might be implicated in the development of cardiovascular risk factors observed in adulthood of IUGR animals.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This study was approved by the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Québec, Canada) weighing 225-250 g were mated with a known fertile male. Day 1 of pregnancy was determined by the presence of spermatozoa in morning vaginal smears. All animals were housed under controlled lighting (6AM-6PM) and temperature ($21 \pm 3^\circ\text{C}$). The dams were randomly assigned to 1 of 2 diets for the last 7 days of gestation (term=day 23). One group was fed a normal diet containing 0.2% sodium (normal diet 5755; PMI Feed Inc., Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and tap water. Their fetuses comprised the control group. The second group received a 0.03% sodium diet (low-sodium diet 5882; PMI Feed Inc.) and demineralized water. Their fetuses suffered from IUGR (IUGR *vs* control: male: 4.7 ± 0.5 g *vs* 5.2 ± 0.5 g, $P < 0.001$ and female: 4.4 ± 0.5 g *vs* 4.9 ± 0.4 g, $P < 0.001$) as previously shown (25).

Tissue collection

On day 22 of gestation, animals were sacrificed (8AM-9AM) by decapitation and sex-separated fetal adrenals ($n=1$ is sex-pooled adrenals from 1 litter per group) were quickly removed and snap-frozen in liquid nitrogen. Rapidly, trunk blood from male and female fetuses was collected in plain tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged at $1,550$ g for 20 min at 4°C . Serum samples were then stored at -80°C until their use to measure sodium and potassium concentrations with specific electrodes as well as aldosterone and corticosterone with a commercial radioimmunoassay kit (aldosterone: Intermedico, Montréal, Québec, Canada; corticosterone: Medicorp, Montréal, Québec, Canada).

RNA isolation

Total RNA from adrenals was extracted by TRIzol reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada). Final RNA pellets were dissolved in an appropriate volume of diethylpyrocarbonate water and stored at -80°C . RNA concentration was established by absorbance measurement at a wavelength of 260 nm, integrity of the samples was ascertained by the 260/280 nm ratio, and quality was verified by ethidium bromide fluorescence. For reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), adrenals from 1 litter were pooled by sex and 6 litters per group were used. Since our results on mRNA expression revealed statistical differences in fetal adrenals

mainly from females, microarray analysis was conducted on female fetuses only. For this experiment, adrenals from 2 litters per group were pooled.

RT-PCR

PCR primers specific for genes of interest (Table 1) were designed with PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) based on sequence data from the National Center for Biotechnology Information. Single-stranded cDNA was created by RT (SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase, Invitrogen) and PCR (Taq DNA Polymerase, Invitrogen), employing the procedure detailed by the manufacturer. The annealing step was carried out for 1 min at temperatures established for each gene in fetal adrenals (Table 1). The extension step was performed at 72°C for 1 min. To ensure that results were collected in the exponential phase, a cycle gradient was established for each gene, and optimal cycle number was determined (Table 1). To make sure that genomic DNA was not amplified, RT was performed without enzyme and PCR done as previously described. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels and quantified by ethidium bromide fluorescence. Amplification products were quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). The procedure was conducted on triplicate samples. The results are reported on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control.

Gene expression microarray

Gene expression was done as previously described (3). In brief, fragmented cRNA (15 mg) was hybridized to U34A genechip (Affymetrix, Santa Clara, CA). The microarray was processed in an Affymetrix GeneChip Fluidic Station 400. The results were analyzed as described elsewhere (28). Genes were considered to be present at 95% confidence ($P < 0.05$) for their expression, and differentially expressed when at least a 2-fold (arbitrary cut-off) difference between IUGR and control values was evident.

Vascular endothelial growth factor (VEGF), Bax and Bcl-2 protein expression

Frozen adrenals (n=10/group) were homogenized in a commercial lysis buffer (1:4 w/v) and centrifuge at 12,000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were collected and used to determine VEGF protein concentrations with an ELISA commercial kit (commercial kit from RayBio® Rat VEGF Elisa kit, RayBiotech, Inc., Norcross, GA) according to the procedure detailed by the manufacturer.

Frozen adrenals (n=6/group) were homogenized in lysis buffer (1:4 w/v) containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate and 1X complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Indianapolis, IN) and centrifuged at 12,000g for 30 min at 4°C. Supernatants were collected and then resuspended in Laemmli buffer. For comparative purposes, 25 µg were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Non specific sites on the membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% skim milk (Bax) or bovine serum albumin (Bcl-2) phosphate-buffered saline (1.4 M NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 17.6 mM KH₂PO₄, pH 7.4)/0.1% Tween 20. Overnight incubation at 4°C was undertaken with rabbit anti-Bax (1/1,000; Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA) or rabbit anti-Bcl-2 (1/1,000; Cell Signalling Technology Inc.). The membranes were then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit IgG (1/5,000; Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) for 45 min at room temperature. Equal protein loading was determined on the same membrane with mouse anti-β-actin primary antibody (1/100,000; Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO) and with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG (1/5,000; Amersham). Immunoreactive bands were visualized with the ECL Western blotting analysis system (GE HealthCare Biosciences Inc., Montréal, Québec, Canada). The bands were quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). The results are expressed as densitometric units relative to β-actin.

Statistical analysis

All results are expressed as mean ± SEM and compared by Student's *t* test. No statistical analysis has been performed between sexes. Statistical significance was assumed with values of *P*<0.05.

RESULTS

Fetal adrenal steroidogenesis

At term, serum aldosterone levels (pmol/L) were markedly elevated in IUGR fetuses compared to their sex-matched controls (male: 7.1 ± 1.2 vs 1.0 ± 0.3 , $P < 0.001$; female: 7.3 ± 1.5 vs 0.9 ± 0.2 , $P < 0.001$). Serum corticosterone concentrations (nmol/mL) were decreased in IUGR male (IUGR vs control: 0.92 ± 0.04 vs 1.06 ± 0.04 , $P < 0.05$) and female (IUGR vs control: 0.80 ± 0.03 vs 1.10 ± 0.06 , $P < 0.001$) fetuses. Potassium and sodium concentrations are 2 known stimulators of adrenal steroidogenesis. Serum potassium levels (mmol/L) were similar between IUGR fetuses and their respective controls (male: 9.2 ± 1.8 vs 9.3 ± 0.9 ; female: 9.9 ± 1.8 vs 9.8 ± 1.6). Sodium content (mmol/L) was reduced in serum from IUGR fetuses compared to their controls (male: 130 ± 4 vs 136 ± 2 , $P < 0.001$; female 132 ± 4 vs 140 ± 2 , $P < 0.001$). This reflects what was obtained in the plasma from low-sodium pregnant rats (25) and could account for the huge increase in aldosterone secretion observed in IUGR fetuses.

To better characterize the mechanisms leading to the different corticosteroid production observed between IUGR and control fetuses, gene expression of components playing a role in these pathways was measured. The AT_1 receptor mRNA expression (Fig. 1A), a main regulator of steroidogenesis, was increased in the adrenals from IUGR fetuses compared to the control ones, but this reached a statistical significance only in females. This was accompanied in the adrenals from IUGR fetuses of both sexes by higher mRNA levels of P450aldo (Fig. 1C), the key-enzyme of aldosterone synthesis. It has been proposed that cytochrome b5, which is present in the rat ZG, participates in aldosterone biosynthesis following AII stimulation (18). However, there were no differences in the mRNA expression of cytochrome b5 in the adrenals from IUGR fetuses compared to controls (data not shown). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mediates the transfer of cholesterol from the outer to the inner membrane of the mitochondria and, thus, is implicated in the rate-limiting step of steroidogenesis. Its mRNA level was decreased in adrenals from IUGR fetuses compared to control ones, but this did not reach statistical significance (Fig. 1B). The same observation has been done for mRNA levels of P45011 β (Fig. 1D), the enzyme involved in corticosterone synthesis. In cell cultures, it has been shown that Cx43 gap junctions, which are mainly expressed in the ZFR, are associated with steroidogenesis (19). Cx43 mRNA expression was similar between adrenals from IUGR and control fetuses of both sexes (date not shown).

Catecholaminergic enzymes in adrenals from IUGR fetuses

In order to estimate the potential of the adrenal gland to produce catecholamines, mRNA expression of the enzymes involved in their synthesis were measured. As shown in Fig. 2A, B and C, mRNA levels of all enzymes were increased in the adrenals from IUGR fetuses compared to their controls. However, for TH (Fig. 2A) and D β H (Fig. 2B), this has reached statistical significance only in females. AT₂ receptor is found in the medulla where it has been linked to catecholamine synthesis and release (5). As shown in Fig. 2D, the AT₂ receptor mRNA expression was increased in IUGR fetuses, but this reached a statistical significance only in females.

VEGF expression and apoptosis in adrenals from IUGR fetuses

In the adrenal, VEGF is involved in the growth of a dense vascular network (35). Also, VEGF is strongly induced by hypoxia (34). VEGF mRNA expression was increased in the adrenals from IUGR female fetuses only (Fig. 3A). VEGF protein was unchanged in the adrenals from IUGR fetuses compared to control ones (Fig. 3B).

Hypoxia can trigger apoptosis through alteration in the expression of p53 and members of the Bcl-2 family (10). The adrenals from IUGR male and female fetuses showed a decreased Bax protein expression (Fig. 4A), but the difference reached statistical significance only in females. Bcl-2 protein expression was similar between adrenals from IUGR fetuses and their sex-matched controls (Fig. 4B). The resulting Bax/Bcl-2 ratio was diminished in the adrenals from IUGR fetuses of both sexes compared to their controls, suggesting lower apoptosis (Fig. 4C).

Gene expression in adrenals from IUGR fetuses

To screen for gene products that may be implicated in the altered adrenal steroidogenesis and in the increased catecholamine synthesis observed in IUGR female fetuses, gene expression microarray methodology was deployed. In the microarray assay, genes for which expression was altered by at least 2-fold in the IUGR groups when compared to the controls were grouped by function and are listed in Table 2. There were 53 genes differentially expressed in the adrenals from IUGR female fetuses compared to control ones. Among those, we found that the changes in the expression of 3 genes related to cholesterol metabolism were either in favor of cholesterol utilization such as the decreased in acetyl-Coenzyme A acetyltransferase (ACAT) 2 expression, or in favor of cholesterol storage, like the increased expression of apolipoprotein E (apoE) and decreased 7-dehydrocholesterol reductase. Two genes involved in steroidogenesis, cytochrome b5 and StAR were

less expressed in adrenals from IUGR female fetuses. For StAR, this confirms the tendency that was observed by RT-PCR. The expression of 15 genes related to immune response and inflammation was increased in adrenals from IUGR female fetuses compared to their controls, and only one chemokine was decreased. Expression of 5 genes known to be direct hypoxia target genes was higher in adrenals from IUGR fetuses compared to control ones. Among these genes, 3 genes, namely transferrin, alpha-fetoprotein and ceruloplasmin, belong to 2 different categories, i.e. acute-phase proteins, immune response and inflammation as well as direct hypoxia target genes where they were placed. Sixteen genes were implicated in metabolism and transport, 3 genes were associated with oxidative stress and 7 genes were involved in transcription regulation and cellular machinery.

DISCUSSION

This study was conducted to investigate the possible fetal adrenal alterations that are associated with IUGR and could predispose to adult diseases. We found in adrenals from day 22 IUGR fetuses an enhanced P450aldo mRNA expression that was associated with an increase in serum aldosterone levels. This secretion was induced by the lower fetal serum sodium content seen in IUGR fetuses. Also, the mRNA expression of StAR and P45011 β was reduced in adrenals from IUGR fetuses, leading to decreased circulating serum corticosterone concentrations. Enzymes of the catecholaminergic pathway were more expressed in adrenals from IUGR fetuses, suggesting higher catecholamine synthesis. These modifications were accompanied by a decreased apoptosis as indicated by the reduced Bax:Bcl-2 ratio. All these changes were more pronounced in female fetuses, revealing a sexual dimorphism in adrenal alterations following IUGR. To unravel mechanisms that might be implicated in these changes, microarray analysis performed on adrenals from IUGR female fetuses was done and suggested inflammation that could be associated with the elevated catecholamine synthesis, and suggested the presence of hypoxia in this IUGR model.

Elevated adrenal mRNA levels of AT₁ receptor and P450aldo associated with a 7-fold increased in serum aldosterone concentrations at day 22 in IUGR fetuses are highly related to the decreased fetal serum sodium content. This corroborates observations showing that sodium restriction in adult male rats increases the number of AT₁ receptor binding sites (13) as well as the AT₁ receptor mRNA (13) and protein (14) levels in adrenal ZG. Cytochrome b5 gene expression was reduced in the microarray analysis, but unchanged in RT-PCR experiments using individual litters. It has been suggested in the adult rat ZG that cytochrome b5 participates in aldosterone synthesis following AII stimulation (18). This association seems not to be present in the fetus, suggesting a different regulation of aldosterone synthesis between fetuses and adults. However, another explanation for this discrepancy could be that, in the present study, mRNA was extracted from whole adrenal glands. Since the ZG is smaller than the ZFR, small differences in gene expression could be masked.

In spite of the heightened aldosterone synthesis, microarray and RT-PCR results indicate that StAR mRNA levels were reduced in adrenals from day 22 IUGR fetuses. As explained previously, mRNA experiments were performed on whole adrenals, as fetal adrenal ZFR is larger and consequently contains more cells than ZG, it could be suggested that the decreased StAR mRNA

might rather be associated with the decreased expression of P45011 β leading to the reduced serum corticosterone concentrations observed in these fetuses. This should be confirmed.

ApoE, a prominent component of triglyceride-rich lipoprotein particles that mediates endocytic uptake of lipoproteins by members of the low-density lipoprotein receptor family (1), is more expressed in adrenals from IUGR female fetuses compared to control ones (microarray). ApoE mRNA is principally localized in ZFR cells of adult rat adrenals (20) where its expression is regulated in direct proportion to esterified cholesterol stores and inversely to the level of steroid production (23). Thus, the decreased corticosterone synthesis seen in IUGR fetuses is in agreement with the augmented apoE expression. Also, the decreased expression of 7-dehydrocholesterol reductase, which catalyses the last step of cholesterol biosynthesis, found in adrenals from IUGR female fetuses (microarray) support the idea of a reduced ZFR cholesterol synthesis in favor of cholesterol storage.

To our knowledge, little has been performed on gene expression in fetal rat adrenals. For example, the present study is the first one to report the expression of ACAT2 and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A (HMG CoA) synthase 2 in fetal rat adrenals. Indeed, the latter enzyme is only expressed in the liver and in gonads of adult rats (26). In the liver, HMG CoA synthase 2 is the rate-limiting step of the ketogenic pathway (11). In gonads, it has been suggested that it could rather perform a similar function to that of the HMG CoA synthase 1 in *de novo* cholesterol biosynthesis as its expression is localized in hormone-producing cells of rat testis and ovary, indicating a link with hormone production rather than a role in the formation of ketone bodies (26). Its decrease in fetal IUGR adrenals is in concordance with the reduced corticosterone production. Further investigations are required to assess the role of HMG CoA synthase 2 in this precise context, but it might be related to steroidogenesis as in gonads.

In adrenals from day 22 IUGR fetuses, we found higher mRNA expression of TH, D β H and PNMT, suggesting that catecholamine synthesis is augmented in these animals. Catecholamine secretion from adrenal medulla chromaffin cells of adult animals is controlled by the cholinergic splanchnic nerve, but this innervation is absent at birth in rats (30), meaning that chromaffin cells has the capacity to release catecholamines without neural stimulation (6). It has been shown that a stress such as maternal hypoxia during the last 3 days of gestation induces an increase in the levels of TH and D β H mRNA in fetal adrenals 1 day before birth (12). Adrenal hypoxia in this IUGR model is

supported by the increased adrenal VEGF mRNA and by the microarray analysis which revealed upregulation of different direct hypoxia target genes, namely insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) 1, transferrin, aldolase A, alpha-fetoprotein and ceruloplasmin. AT_2 receptor promotes catecholamine release in adrenals of adult rats (5). Moreover, AII has been shown to stimulate the expression of the hypoxia-inducible factor, a key mediator of hypoxic responses, through the AT_2 receptor in PC12 cells, an adrenal chromaffin cell line (38). In our study, adrenals from IUGR fetuses, at least in females, expressed higher levels of the AT_2 receptor mRNA. This increase associated with the presence of hypoxia might explain the higher catecholamine synthesis and release. Differential expression of more than 15 genes related to immune response and inflammation has been observed in adrenals from day 22 IUGR female fetuses. In fact, many of these genes are coding for acute-phase proteins, such as haptoglobin, serpin1, fibrinogen, alpha 1 microglobulin/bikunin, complement component 3, transferrin, albumin, alpha-fetoprotein and ceruloplasmin among others (9). It was demonstrated that adrenal catecholamines are necessary for the induction of many of these acute-phase proteins (36). Therefore, these results suggest that the increased catecholamine synthesis in IUGR fetuses could stimulate the expression of acute-phase proteins, which are involved in inflammation and immune response.

In summary, alterations in adrenal steroidogenesis and an increased catecholamine synthesis are observed in IUGR rat fetuses induced by a maternal low-sodium diet. Indeed, IUGR fetuses presented an increased aldosterone synthesis and release due to the higher adrenal expression of AT_1 receptor and P450aldo in response to the decreased sodium content. The reduced corticosterone concentrations are linked to changes in adrenal ZFR gene and protein expression involved in cholesterol metabolism (apoE, 7-dehydrocholesterol reductase), steroidogenesis (StAR, P45011 β) which all promote cholesterol storage. Also, the increased AT_2 receptor expression in association with the presence of hypoxia could explain the higher catecholamine synthesis and release which might be related to the induction of the inflammation-related acute-phase response observed in IUGR fetuses. All of these modifications might have long-lasting health effects and thus, could be implicated in the pathogenesis of high blood pressure (4) and cardiac hypertrophy (3) observed in these IUGR adult animals.

REFERENCES

1. **Azhar S and Reaven E.** Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 195: 1-26, 2002.
2. **Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D and Wadsworth ME.** Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298: 564-567, 1989.
3. **Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J and Brochu M.** Intrauterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 565: 197-205, 2005.
4. **Battista MC, Oligny LL, St-Louis J and Brochu M.** Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E124-E131, 2002.
5. **Belloni AS, Andreis PG, Macchi V, Gottardo G, Malendowicz LK and Nussdorfer GG.** Distribution and functional significance of angiotensin-II AT1- and AT2-receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Endocr Res* 24: 1-15, 1998.
6. **Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Girard E and Shimahara T.** Catecholamine secretion from rat foetal adrenal chromaffin cells and hypoxia sensitivity. *Pflugers Arch* 454: 83-92, 2007.
7. **Chatelain A, Durand P, Naaman E and Dupouy JP.** Ontogeny of ACTH(1-24) receptors in rat adrenal glands during the perinatal period. *J Endocrinol* 123: 421-428, 1989.
8. **Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Menheere PP, Schouten HJ and Peeters LL.** Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 85: 361-367, 1995.
9. **Gabay C and Kushner I.** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340: 448-454, 1999.
10. **Greijer AE and van der WE.** The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57: 1009-1014, 2004.
11. **Hegardt FG.** Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J* 338 (Pt 3): 569-582, 1999.
12. **Holgert H, Pequignot JM, Lagercrantz H and Hokfelt T.** Birth-related up-regulation of mRNA encoding tyrosine hydroxylase, dopamine beta-hydroxylase, neuropeptide tyrosine, and prepro-enkephalin in rat adrenal medulla is dependent on postnatal oxygenation. *Pediatr Res* 37: 701-706, 1995.
13. **Lehoux JG, Bird IM, Briere N, Martel D and Ducharme L.** Influence of dietary sodium restriction on angiotensin II receptors in rat adrenals. *Endocrinology* 138: 5238-5247, 1997.

14. **Lehoux JG, Bird IM, Rainey WE, Tremblay A and Ducharme L.** Both low sodium and high potassium intake increase the level of adrenal angiotensin-II receptor type 1, but not that of adrenocorticotropin receptor. *Endocrinology* 134: 776-782, 1994.
15. **Mamet J, Peyronnet J, Roux JC, Perrin D, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Lagercrantz H and Dalmaz Y.** Long-term prenatal hypoxia alters maturation of adrenal medulla in rat. *Pediatr Res* 51: 207-214, 2002.
16. **McMillen IC and Robinson JS.** Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571-633, 2005.
17. **Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M and Ishimura Y.** Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology* 140: 3342-3353, 1999.
18. **Mitani F, Ogishima T, Mukai K, Hoshino R, Watanabe K and Suematsu M.** Possible participation of outer mitochondrial membrane cytochrome B5 in steroidogenesis in zona glomerulosa of rat adrenal cortex. *Endocr Res* 30: 639-644, 2004.
19. **Murray SA, Davis K and Gay V.** ACTH and adrenocortical gap junctions. *Microsc Res Tech* 61: 240-246, 2003.
20. **Nicosia M, Prack MM and Williams DL.** Differential regulation of apolipoprotein-E messenger RNA in zona fasciculata cells of rat adrenal gland determined by in situ hybridization. *Mol Endocrinol* 6: 288-298, 1992.
21. **Pankratz DS.** The development of the suprarenal gland in the albino rat with a consideration of its possible relation to the origin of foetal movements. *Anat Rec* 49: 31-49, 1931.
22. **Phillips ID, Simonetta G, Owens JA, Robinson JS, Clarke IJ and McMillen IC.** Placental restriction alters the functional development of the pituitary-adrenal axis in the sheep fetus during late gestation. *Pediatr Res* 40: 861-866, 1996.
23. **Prack MM, Nicosia M, Williams DL and Gwynne J.** Relationship between apolipoprotein E mRNA expression and tissue cholesterol content in rat adrenal gland. *J Lipid Res* 32: 1611-1618, 1991.
24. **Ross JT, Phillips ID, Simonetta G, Owens JA, Robinson JS and McMillen IC.** Differential effects of placental restriction on IGF-II, ACTH receptor and steroidogenic enzyme mRNA levels in the foetal sheep adrenal. *J Neuroendocrinol* 12: 79-85, 2000.
25. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180: 608-613, 1999.
26. **Royo T, Pedragosa MJ, Ayte J, Gil-Gomez G, Vilaro S and Hegardt FG.** Testis and ovary express the gene for the ketogenic mitochondrial 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J Lipid Res* 34: 1636, 1993.

27. **Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdes G and Donoso E.** Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 81: 1029-1033, 1993.
28. **Sasik R, Calvo E and Corbeil J.** Statistical analysis of high-density oligonucleotide arrays: a multiplicative noise model. *Bioinformatics* 18: 1633-1640, 2002.
29. **Seidl K and Unsicker K.** The determination of the adrenal medullary cell fate during embryogenesis. *Dev Biol* 136: 481-490, 1989.
30. **Seidler FJ and Slotkin TA.** Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* 358: 1-16, 1985.
31. **Shanmugam S, Corvol P and Gasc JM.** Ontogeny of the two angiotensin II type 1 receptor subtypes in rats. *Am J Physiol* 267: E828-E836, 1994.
32. **Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E, Corvol P and Gasc JM.** Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol* 268: F922-F930, 1995.
33. **St-Louis J, Sicotte B, Beausejour A and Brochu M.** Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 131: 331-339, 2006.
34. **Takahashi H and Shibuya M.** The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 109: 227-241, 2005.
35. **Thomas M, Keramidas M, Monchaux E and Feige JJ.** Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech* 61: 247-251, 2003.
36. **van GJ, Boers W, Sala M and Ladiges NC.** Glucocorticoids and catecholamines as mediators of acute-phase proteins, especially rat alpha-macrofoetoprotein. *Biochem J* 220: 125-132, 1984.
37. **Verhofstad AA, Hokfelt T, Goldstein M, Steinbusch HW and Joosten HW.** Appearance of tyrosine hydroxylase, aromatic amino-acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase during the ontogenesis of the adrenal medulla: an immunohistochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* 200: 1-13, 1979.
38. **Wolf G, Schroeder R and Stahl RA.** Angiotensin II induces hypoxia-inducible factor-1 alpha in PC 12 cells through a posttranscriptional mechanism: role of AT2 receptors. *Am J Nephrol* 24: 415-421, 2004.
39. **Wotus C, Levay-Young BK, Rogers LM, Gomez-Sanchez CE and Engeland WC.** Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* 139: 4397-4403, 1998.

40. **Yamamoto M, Yanai R and Arishima K.** Study of migration of neural crest cells to adrenal medulla by three-dimensional reconstruction. *J Vet Med Sci* 66: 635-641, 2004.

Figure legends

Figure 1. mRNA expression of (A) AT₁ receptor, (B) StAR, (C) P450aldo and (D) P45011 β in adrenals from day 22 control (open bars) and IUGR (closed bars) fetuses.

The results are expressed as means \pm SEM from sex-pooled adrenals from 6 litters per group. Values significantly different from control animals are indicated by * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001.

Figure 2. mRNA expression of (A) TH, (B) D β H, (C) PNMT and (D) AT₂ receptor in adrenals from day 22 control (open bars) and IUGR (closed bars) fetuses.

The results are expressed as means \pm SEM from sex-pooled adrenals from 6 litters per group. IUGR groups significantly different from control animals are indicated by * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001.

Figure 3. VEGF expression in adrenals from day 22 control (open bars) and IUGR (solid bars) fetuses.

Respectively, sex-pooled adrenals from 6 and 10 litters per group were used to evaluate expression of VEGF mRNA (A) and protein (B). The results are expressed as means \pm SEM. IUGR groups significantly different from control animals are indicated by *** P <0.001.

Figure 4. Fetal adrenal levels of (A) the pro-apoptotic protein Bax, (B) the anti-apoptotic protein Bcl-2 and (C) the apoptotic index in day 22 control (open bars) and IUGR (solid bars) fetuses.

Representative immunoblots and data from densitometric analyses expressed in arbitrary units relative to β -actin for Bax (A) and Bcl-2 (B). Rat thymus lysate serves as positive control. Bax/Bcl-2 ratio (C) is represented using arbitrary units from densitometric analyses. Data for all densitometric analyses depicted represent means \pm SEM from sex-pooled adrenals from 6 litters per group. IUGR groups significantly different from control animals are indicated by ** P <0.01 and *** P <0.001.

Table 1. PCR primers designed (by alpha DNA) for genes of interests

Gene - gene number	FP: Forward Primer (5'→3') RP: Reverse Primer (5'→3')	Product size (bp)	Optimal conditions	
			Temperature (°C)	Cycle (number)
Angiotensin receptor type 1 (AT₁) - NM_031009				
	FP: GCTAAGCAGCTCACTCACTAC RP: AACCTTGACCTCCCATCTC	363	57	28
Angiotensin receptor type 2 (AT₂) - NM_012494				
	FP: GAAGGACAACCTTCAGTTTTGC RP: CAAGGGGAACTACATAAGATGC	497	57	26
Connexine 43 (Cx43) - NM_012567				
	FP: TGAGTCCTCCACATAGCG RP: GCAAAGAACCCAGTGAGA	250	57	20
Cytochrome b5 - NM_022245				
	FP: GCACCTGGGTGATCCTACAT RP: TCTCGTGCATCCGTAGAGTG	148	59	22
Cytochrome P450 aldosterone synthase (P450aldo) - NM_012538				
	FP: TCATAATCCGAGATGGTAGCA RP: GCTCAGGTCTTGGGAACAC	324	54	28
Cytochrome P450 11β-hydroxylase (P45011β) - XM_343262				
	FP: TCATAATCCGAGATGGTAGCA RP: GCTCAGGTCTTGGGAACAC	399	54	20
Dopamine β-hydroxylase (DβH) - NM_013158				
	FP: CTGGATAACCCATCAGGACTA RP: CCAGGATCCCATACACTAGA	148	57	26
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) - NM_017008				
	FP: GGTGATGCTGGTGCTGAGTA RP: GGATGCAGGGATGATGTTCT	369	55	20
Phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT) - XM_001081395				
	FP: CCTACCTCCGCAACAACACTAC RP: TCTGTCATGGTGATGTCCCTC	202	58	24
Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) - NM_031558				
	FP: GGTGATGCTGGTGCTGAGTA RP: GGATGCAGGGATGATGTTCT	453	55	18
Tyrosine hydroxylase (TH) - NM_012740				
	FP: CGTCGGAAGCTGATTGCA RP: TCACGGGCGGACAGTAGA	290	60	26
Vascular endothelial growth factor (VEGF) - NM_031836				
	FP: TGCACCCACGACAGAAGGGGA RP: TCACCGCCTGGCTGTGCACAT	4 variants: 564, 492, 432 and 360	65	30

Table 2. Relative changes in the expression of genes modulated by IUGR in the adrenal of female fetuses on day 22

Gene name	Probe set name	Fold change
Cholesterol metabolism and steroidogenesis		
Apolipoprotein E (ApoE)	S76779_s_at	2,62
Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase (ACAT) 2	rc_AA859980_at	-3,09
	rc_AA859980_g_at	-2,28
Cytochrome b5	rc_AA945054_s_at	-2,24
	AF007107_s_at	-2,02
Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)	AB001349_at	-2,31
7-dehydrocholesterol reductase	AB016800_g_at	-2,31
	AB016800_at	-2,20
Acute-phase proteins, immune response and inflammation		
Haptoglobin	K01933_at	4,97
Fibrinogen, alpha polypeptide	rc_AA875097_at	4,48
	M35601_g_at	2,69
	M35601_at	2,20
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 (Serpin1)	rc_A1010453_at	3,88
	X16273cds_g_at	3,14
	X16273cds_at	2,95
Fibrinogen, gamma polypeptide	J00735_at	3,79
	X05861exon#1-6_s_at	2,45
	J00735_g_at	2,15
Fibrinogen, B beta polypeptide	U05675_at	3,64
Alpha 1 microglobulin/bikunin	S87544_g_at	3,22
Complement component 3	M29866_s_at	3,12
	X52477_at	2,64
Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3	X83231_at	2,95
Kininogen 1 (or K-kininogen or similar to alpha-1 major acute phase protein prepeptide)	K02814_g_at	2,84
	K02814_at	2,36
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	L18948_at	2,49
Alpha-2-HS-glycoprotein	D10261_g_at	2,28
Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	X71127_g_at	2,14
Albumin	rc_AA860062_g_at	2,12
CD24 antigen	rc_A1171462_s_at	2,11
Vitronectin	U44845_at	2,09
Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	rc_AA874803_g_at	-2,10
Direct hypoxia target genes		
Insulin-like growth factor binding protein 1	M58634_at	5,51
Transferrin	U31866_g_at	2,68
Transferrin, signal recognition particle receptor, B subunit	D38380_at	2,56
Aldolase A, similar to Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase)	U20643mRNA#2_f_at	2,22
Alpha-fetoprotein	rc_A1237884_s_at	2,03
Ceruloplasmin	L33869_at	2,03
Enzymes and metabolism		
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	M33648_at	5,11
	M33648_g_at	3,54
4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	AF082834_s_at	3,62
	rc_AA866302_g_at	3,52
Aldolase B	X02291exon_s_at	2,69
	X02284_at	2,04
UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1, A2, A3, A5, A6, A7, A8 and A10	D83796_s_at	2,62
Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT)	AF038870_at	2,40
Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	D43623_g_at	2,32
UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6	D38061exon_s_at	2,12
Alcohol dehydrogenase 1 (class I)	M15327_at	2,11
Beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	M83143_at	2,10
Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta	M12492mRNA#1_g_at	-2,19
Protease, serine, 35	rc_AA866443_at	-2,09
Ornithine decarboxylase antizyme	D10706_s_at	-2,07
Transport		
Retinol binding protein 4, plasma	K03045cds_s_at	3,44
	M10934_s_at	2,09
Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	AB008423_s_at	2,42
Solute carrier family 4, member 2	J05166_at	2,18
Solute carrier family 41, member 3	rc_AA799457_at	-2,21

Oxidative stress		
Thioredoxin interacting protein	rc_A1237654_at	2,64
Selenoprotein W muscle 1	U25264_at	2,00
Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Y00497_s_at	-2,65
Transcription regulation and cellular machinery		
Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	X99470_at	2,20
Parathyromosin	rc_AA892800_at	2,19
Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	M21476_s_at	2,12
Neuronatin	U08290_at	2,09
Similar to splicing factor, arginine/serine-rich 2	rc_AA799538_g_at	-2,40
Y box protein 1	rc_A1230572_at	-2,30
Chromobox homolog 1 (Drosophila HP1 beta) (predicted)	rc_A1009141_at	-2,03

Values are expressed as fold change in expression in IUGR female fetuses when compared to controls. Genes are considered to be differentially expressed when at least a 2-fold (arbitrary cut-off) difference between control and experimental values is evident.

Figure 1.

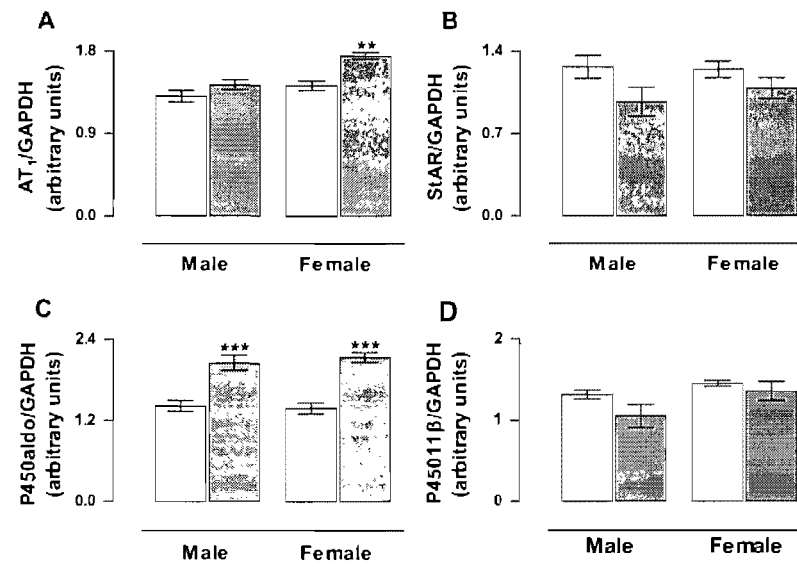


Figure 2.

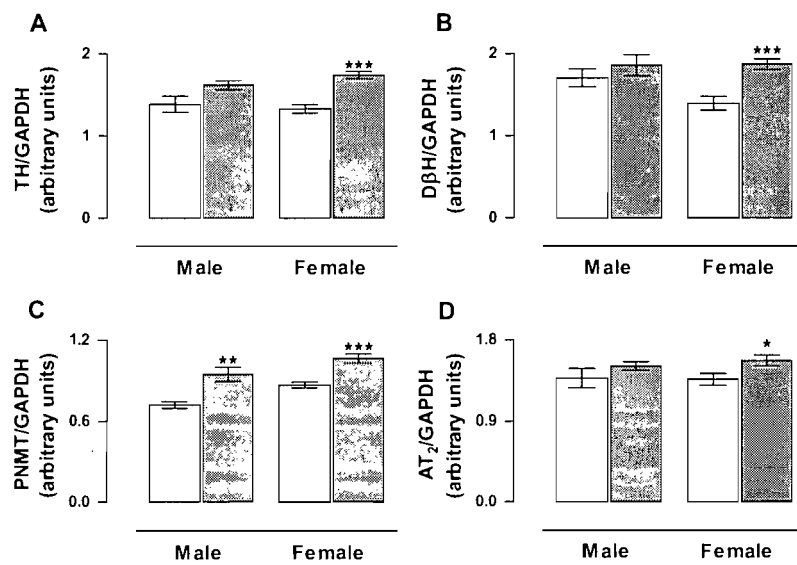


Figure 3.

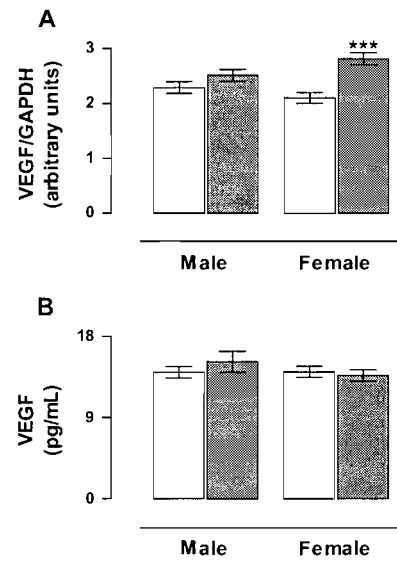
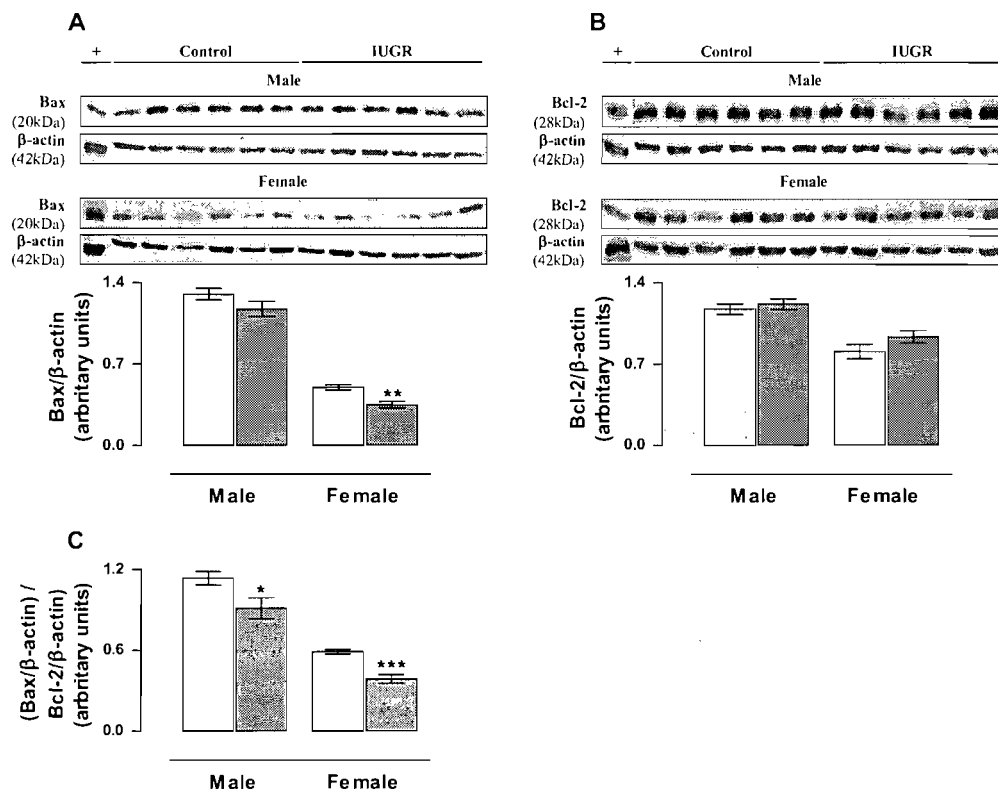


Figure 4.



CHAPITRE 5. DISCUSSION ET CONCLUSION

En science, la phrase la plus excitante que l'on peut entendre, celle qui annonce de nouvelles découvertes, ce n'est pas «Euréka» mais «c'est drôle».

– Isaac Asimov, écrivain russe –

Nous avons développé dans le laboratoire un modèle animal de RCIU en donnant une diète faible en sodium à des rates au cours du dernier tiers de gestation [228]. Une partie des travaux réalisés avant mon arrivée au sein de l'équipe a démontré que ce traitement empêche l'expansion volémique maternelle [228] et l'augmentation du diamètre des artères utérines [252] associées à la gestation normale, indiquant une réduction de la perfusion utéro-placentaire à l'origine de la diminution du poids des placentas [228] et de la redistribution du flot sanguin observée chez les fœtus RCIU [26]. Parallèlement, l'équipe de Caluwaerts [45] a établi que l'invasion trophoblastique endovasculaire nécessaire au remodelage des artères utérines et à l'établissement de la circulation utéro-placentaire définitive s'amorce à G13 chez le rat. Considérant l'ensemble de ces éléments, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux altérations et aux mécanismes placentaires susceptibles d'expliquer la restriction de croissance placentaire et fœtale observée dans notre modèle animal. De plus, des études produites chez les animaux RCIU de 12 semaines ont révélé diverses atteintes systémiques menant au développement de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires tels que la dysfonction rénale [26], les altérations du système rénine-angiotensine-aldostérone [26], le remodelage cardiaque hypertrophique [25] et une réponse altérée au sel [Bibeau et collègues, manuscrit en préparation]. Puisque le développement de la surrénale chez le rat débute dès G13 [200;282] et se poursuit jusqu'au terme de la gestation avec l'apparition autour de la naissance d'une zonation corticale fonctionnelle similaire à celle observée chez l'adulte [186;279] et d'une médullosurrénale centrale synthétisant de l'épinéphrine [186;282], nous nous sommes ensuite attardés à la caractérisation de cette glande chez le fœtus à terme (G22) avec l'objectif de mettre en relief des altérations susceptibles de contribuer aux conséquences à long terme observées chez les animaux RCIU.

Ainsi, nous avons formulé l'hypothèse que la RCIU observée dans notre modèle animal serait associée à une hypoxie placentaire, conséquemment à une réduction de la perfusion utéro-placentaire, entraînant une programmation fonctionnelle de la surrénale fœtale par des modifications de la stéroïdogénèse et de la synthèse des catécholamines. Ces changements pourraient être à l'origine du développement des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires observés chez les

animaux RCIU de 12 semaines [25;26]. Notre modèle animal étant pertinent à la condition humaine où la RCIU est associée à une réduction de l'expansion volémique maternelle [83;226;229], ces travaux aideront à une meilleure compréhension des mécanismes qui sont induits dans le placenta et la surrénale fœtale suite à cette situation d'absence d'expansion volémique chez la mère et pourraient servir à établir un diagnostic et peut-être conduire à la prévention des conséquences à court et long terme d'une RCIU.

Dans les placentas de rates sous restriction sodique, nous avons observé une augmentation de l'expression du VEGF, particulièrement dans la zone labyrinthe où se produisent les échanges fœto-maternels, et du VEGFR1. Ces résultats nous suggèrent que la restriction de croissance placentaire et fœtale présente dans notre modèle animal est médiée, du moins en partie, par une hypoxie placentaire, vraisemblablement consécutive à la réduction de la perfusion utéro-placentaire. Il a été mis en évidence que le VEGFR1 joue un rôle tardif dans le développement placentaire par sa participation à l'assemblage du réseau vasculaire [92]. L'expression accrue du VEGF et du VEGFR1 laisse supposer que l'assemblage de vaisseaux sanguins est favorisé de manière à compenser la diminution de perfusion utéro-placentaire présente dans notre modèle. Considérant que nos travaux ont été effectués sur des placentas à terme où les actions du VEGF diffèrent probablement de sa mission première qu'est l'angiogenèse, il est possible qu'il intervienne par le VEGFR1 dans la perméabilité des vaisseaux afin de faciliter le transfert de l'oxygène et des nutriments de la mère aux fœtus. Néanmoins, le VEGFR2 demeure le principal récepteur par lequel le VEGF assure ses actions [227], l'augmentation protéique de eNOS remarquée dans notre étude supportant cette idée. Cette hausse présume une dilatation vasculaire visant le maintien de la fonction placentaire et de l'approvisionnement sanguin aux fœtus. De plus, les placentas issus de rates sous restriction sodique présentent un taux augmenté d'apoptose, suggérant une implication de ce phénomène dans la diminution du poids des placentas par ses effets sur la différenciation et le renouvellement des cellules trophoblastiques. Des mesures stéréologiques permettant l'évaluation de la vascularisation placentaire pourraient être entreprises à partir de coupes histologiques et de marqueurs spécifiques. En regard des résultats obtenus, nous devrions être en mesure d'observer une augmentation du nombre et du diamètre des vaisseaux sanguins, particulièrement des capillaires trouvés dans les extrémités des villosités placentaires. Également, la localisation – types cellulaires, zones placentaires – des changements observés nous permettrait de tirer des conclusions plus pointues par rapport à la caractérisation de l'hypoxie présente dans notre modèle.

Néanmoins, il apparaît que cette compensation ne suffit pas à subvenir aux besoins en oxygène des fœtus RCIU. En effet, même si le poids des organes fœtaux tels que le cerveau, le cœur et le rein indique une redistribution du flot sanguin suite à la réduction de la perfusion utéro-placentaire [26], l'analyse d'expression génique par microréseau produite à partir de surrénales fœtales de femelles révèle une hypoxie chez ces animaux. De ce fait, la surrénale fœtale présente de nombreuses altérations au niveau de l'expression de gènes impliqués, entre autres, dans la stéroïdogénèse et la synthèse des catécholamines. D'ailleurs, la réduction des niveaux sériques de corticostérone chez les fœtus RCIU combinés à l'absence de changements d'expression génique et protéique de la 11 β HSD2 placentaire, nous a permis de démontrer que la RCIU observée dans notre modèle animal ne semble pas associée à une surexposition aux glucocorticoïdes d'origine maternelle. À la lumière de ces résultats, il serait toutefois pertinent de jeter un œil à la fonctionnalité de l'axe hypothalamo-hypophysaire, à savoir la synthèse et la relâche de CRH par l'hypothalamus et d'ACTH par l'hypophyse ainsi que l'efficacité du rétro-contrôle négatif par le GR. En effet, la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire survient au cours du dernier tiers de la gestation chez le rat avec la production et la sécrétion de CRH [37] et d'ACTH [53] dès G16-G17 et pourrait donc être influencée par la diète faible en sodium donnée aux rates lors de cette même période. De plus, les surrénales des fœtus RCIU démontrent une réduction de l'index apoptotique et des études d'expression génique par microréseau ont mis en évidence des modifications du métabolisme du cholestérol ainsi que la présence d'inflammation, du moins chez les femelles RCIU. Il est possible que ces changements entraînent des réponses spécifiques et adaptatives chez le fœtus, provoquant des modifications permanentes et délétères de sa physiologie qui se manifesteront lors de la vie adulte par le développement de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires [25;26]. Par exemple, les concentrations élevées d'aldostérone chez les fœtus RCIU pourraient initier des changements conduisant au remodelage cardiaque de type hypertrophique observé chez les femelles adultes [25]. De même, les catécholamines en concentrations plus élevées chez les fœtus RCIU pourraient être à l'origine d'altérations de la fonction cardiovasculaire impliquées dans l'augmentation de la pression artérielle remarquée chez ces animaux à 12 semaines [26].

Nous travaillons avec une souche non consanguine de rats (Sprague-Dawley) réputée pour sa variabilité génétique. Bien qu'elle ait l'important avantage d'être représentative de la population en général par rapport aux souches consanguines où les individus sont génétiquement identiques [116], cette variabilité fait en sorte que les paramètres examinés lors de nos manipulations témoignent d'une

hétérogénéité de réponses non négligeable qui nous oblige à confirmer de diverses manières les données récoltées. Ainsi, nous avons utilisé plusieurs marqueurs de l'hypoxie pour en déterminer la présence. De même, différentes techniques ont été employées pour évaluer l'expression du VEGF, notamment la transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne, l'ELISA et l'immunohistochimie. De plus, nous privilégions l'utilisation de pool de tissus provenant d'une même portée afin de réduire les fluctuations. Néanmoins, combinée à la multiplicité de nos mesures/techniques, cette approche nous permet de dégager des tendances et d'en tirer des conclusions logiques pertinentes. Par exemple, les concentrations sériques de corticostérone sont réduites chez les fœtus RCIU. Nous avons attribué ce changement à une diminution de l'expression protéique du CYP11B1 dans la surrénale fœtale, même si la signification statistique n'est présente que chez les mâles, puisque les niveaux d'ARNm et de protéine tendent tous deux à être inférieurs à ceux observés chez les animaux témoins.

Dans le cadre de mes études doctorales, nous avons choisi de limiter notre champ d'investigation à G22, soit au terme de la gestation, avec pour objectif principal de mettre en évidence des modifications placentaires et fœtales ayant atteint leur paroxysme puisque le G22 représente la dernière journée de la période de traitement maternel (diète faible en sodium de G15 à G22) et que cette période coïncide précisément avec la phase de croissance maximale du placenta et du fœtus chez le rat. À la lumière des résultats obtenus, il apparaît qu'une étude longitudinale s'étendant de la dernière semaine de gestation à quelques jours, voire une semaine ou deux de vie post natale serait de mise. En effet, ces travaux nous permettraient de documenter de façon séquentielle les événements survenant au cours de la dernière semaine de gestation et ce, tant par rapport aux modifications physiologiques maternelles et aux altérations du développement placentaire qu'à la réponse fœtale à tous ces changements. De cette manière, il nous serait possible de départager les causes des conséquences des différents phénomènes que nous observons dans notre modèle animal de RCIU. De plus, une étude longitudinale prolongée de la vie fœtale à la vie extra-utérine nous fournirait la possibilité de vérifier au niveau fonctionnel par la mesure, entre autres paramètres, de la pression artérielle systolique, les séquelles à court et long terme laissées par les conditions intra-utérines défavorables. La période de lactation étant également une période critique de développement [15], la mise en place d'une étude longitudinale nous permettrait de jeter un œil à la qualité et à la composition du lait maternel et d'évaluer par des études de « *cross-fostering* » les effets de la diète maternelle sur la lactation et les conséquences de celle-ci sur le devenir des animaux. La connaissance

de la séquence de l'ensemble des modifications observées dans notre modèle animal permettrait d'envisager des cibles et des interventions thérapeutiques susceptibles d'améliorer le devenir des animaux RCIU.

Nos résultats démontrent un dimorphisme sexuel chez les fœtus RCIU à G22. En effet, les différentes analyses d'expression génique et protéique réalisées à partir de surrénales fœtales révèlent des changements plus prononcés chez les femelles que chez les mâles, que l'on pense aux enzymes de la synthèse des catécholamines ou aux marqueurs apoptotiques. Puisque le placenta est une structure essentiellement issue du blastocyste, il pourrait jouer un rôle dans cette réponse différentielle. Nos travaux sur le placenta ayant été produits à partir d'un pool de placentas, les distinctions potentielles attribuables au sexe ont vraisemblablement été masquées. Il serait donc intéressant de vérifier ce point lors d'études ultérieures, ce qui nous permettrait de répondre à la question : le placenta a-t-il un sexe? À notre connaissance, aucune étude ne supporte cette idée dans la littérature. Néanmoins, un certain nombre de travaux démontre aussi la présence d'un dimorphisme sexuel chez les fœtus, notamment par rapport à la maturation des poumons et la synthèse de surfactant. Dans ce cas, un rôle des androgènes a été mis en évidence [264], indiquant l'implication des hormones sexuelles dans le développement d'un dimorphisme sexuel avant la naissance. Les mécanismes épigénétiques et l'empreinte parentale pourraient également contribuer au phénomène de dimorphisme sexuel par la modulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement et la croissance du fœtus.

En effet, les différences observées entre les cellules, les tissus et les organes ne sont pas dues à des modifications de la séquence nucléotidique, mais à une modulation spécifique de l'expression des gènes par des mécanismes épigénétiques [216]. Le code épigénétique représente un ensemble de mécanismes de régulation interreliés et interdépendants (codes de la méthylation de l'ADN, des histones et des coactivateurs/corépresseurs de la transcription) qui assurent l'expression ou la répression des gènes de façon tissu-spécifique et selon le stade de développement [139]. L'information épigénétique au sein de la chromatine est essentiellement véhiculée par des modifications de l'ADN et des histones [97]. La méthylation de la cytosine est la principale modification de l'ADN et est généralement synonyme d'une chromatine transcriptionnellement silencieuse [31;76;137]. Les histones peuvent quant à elles subir plusieurs modifications (acétylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitinylation) qui influencent la structure chromatinienne et l'expression génique [157]. Le caractère réversible de ces modifications met en évidence la plasticité de

l'information épigénétique. Des études chez le rat en période néonatale ont entre autres démontré qu'une insuffisance utéro-placentaire est associée à une hypométhylation de l'ADN et à une hyperacétylation des histones au niveau rénal [208], hépatique [96;170] et cérébral [146]. De cette façon, l'altération des déterminants épigénétiques entraîne des changements de la structure de la chromatine responsables de la dérégulation de l'expression des gènes. Il a été postulé que ces changements contribueraient au déclenchement des pathologies souvent observées dans les cas de RCIU [42]. Ainsi, tous gènes dont l'expression est modifiée dans notre modèle animal de RCIU laissent supposer des modifications épigénétiques pouvant influencer aussi bien la survenue du dimorphisme sexuel que le développement de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, les deux phénomènes étant observés chez les animaux RCIU.

Très peu de gènes, une centaine sur les 30 000 que contient le génome humain, sont soumis à l'empreinte parentale [185]. Ainsi, un seul allèle d'un gène de ce type est exprimé dans les cellules; l'expression d'un gène soumis à l'empreinte paternelle étant soutenue par l'allèle maternel et vice-versa. Chez l'humain [185] et la souris [61], plusieurs des gènes soumis à l'empreinte sont exprimés dans le placenta et jouent un rôle dans la croissance fœtale et la régulation des interactions de l'interface fœto-maternelle [218]. Le mécanisme moléculaire prédominant de la régulation de ces gènes est la méthylation des îlots CpG [163;220], leur expression monoallélique étant sous-tendue par une méthylation différentielle de certaines régions de l'ADN, les régions différenciellement méthylées (*differentially methylated region* : DMR), qui sont présentes dans ou à distance des gènes. Cette expression peut varier selon le contexte génétique, la nature tissulaire et la période de développement [219]. Ainsi, des études portant sur l'expression de ces gènes pourraient nous fournir des explications par rapport aux mécanismes sous-jacents à la restriction de la croissance placentaire et fœtale observée dans notre modèle animal ainsi que sur l'apparition du dimorphisme sexuel observé chez ces animaux.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux démontrent que la diminution de la perfusion utéro-placentaire – conséquente à la réduction de l'expansion volémique maternelle et de l'augmentation du diamètre des artères utérines induite par une diète faible en sodium donnée lors du dernier tiers de la gestation – est liée à une hypoxie et une apoptose placentaires entraînant une redistribution du flot sanguin chez les fœtus et causant une hypoxie fœtale associée à une programmation fonctionnelle de la surrénale (Figure 15). Ces changements seraient à l'origine de réponses adaptatives du fœtus en regard de son environnement, entraînant des modifications permanentes et néfastes de son

organisme et de ses systèmes biologiques qui se manifesteront lors de la vie adulte par le développement des différents facteurs de risque des maladies cardiovasculaires dénotés chez les animaux RCIU à 12 semaines [25;26].

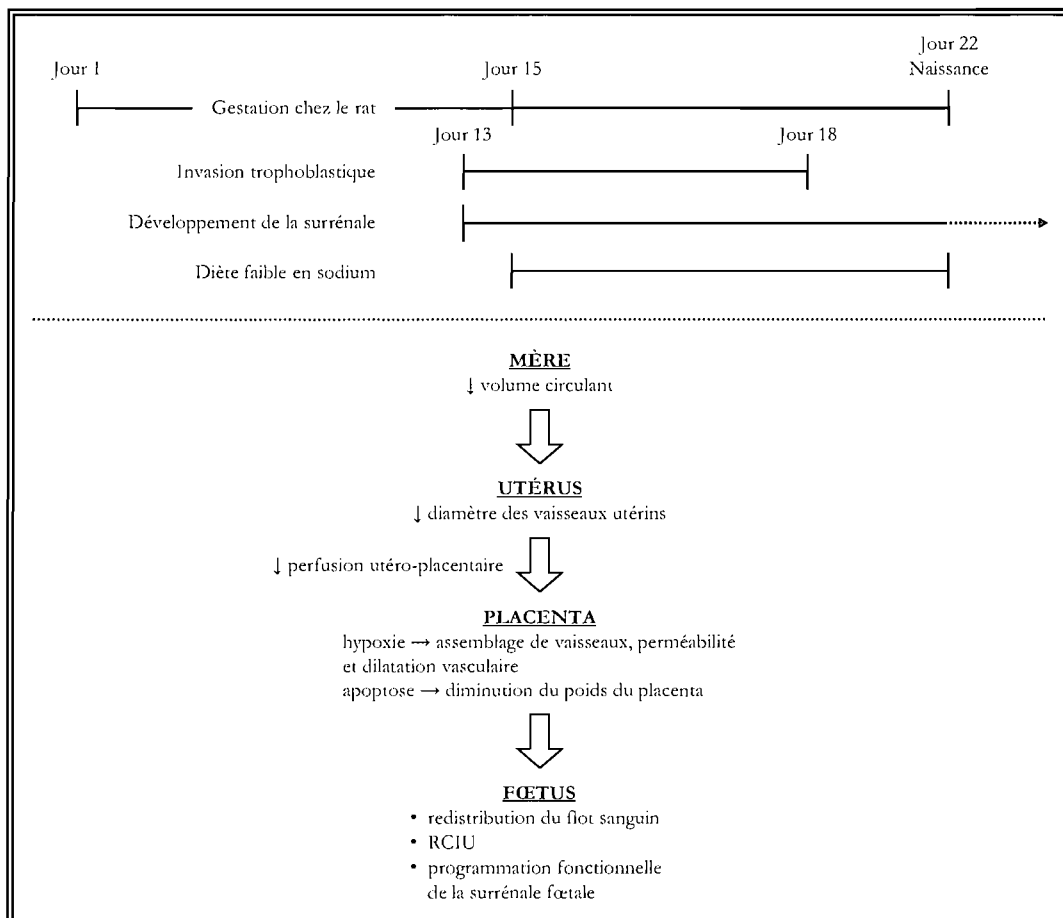


Figure 15. Hypoxie placentaire et programmation de la surrénale dans un modèle de rat de RCIU induite par une diète maternelle faible en sodium.

Adaptée de [45;200;228;269;282].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses - National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, August 17-18, 2000. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 144-150.
- [2] AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 2001; 276: 39721-39726.
- [3] Aguilera G, Nikodemova M, Wynn PC, Catt KJ. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 2004; 25: 319-329.
- [4] Aguilera G, Rabadan-Diehl C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept* 2000; 96: 23-29.
- [5] Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review. *Placenta* 2000; 21 Suppl A: S16-S24.
- [6] Al-Hijji J, Andolf E, Laurini R, Batra S. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 51.
- [7] Albery M, Soothill P. Management of fetal growth restriction. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 92: F62-F67.
- [8] Alpy F, Tomasetto C. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J Cell Sci* 2005; 118: 2791-2801.
- [9] Alsat E, Malassine A, Tarrade A, Merviel P, Évain-Brion D. [Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste]. *Med Sci (Paris)* 1999; 15: 1236-1243.
- [10] Anderson DJ, Axel R. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* 1986; 47: 1079-1090.
- [11] Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 521-531.
- [12] Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 2004; 561: 355-377.
- [13] Aron DC, Findling JW, Blake Tyrrell J. Hypothalamus and pituitary gland. In: Greenspan FS, Gardner DG (eds), *Basic & clinical endocrinology*, 7th ed. McGraw-Hill Companies; 2004: 106-175.
- [14] Aron DC, Findling JW, Blake Tyrrell J. Glucocorticoids & adrenal androgens. In: Greenspan FS, Gardner DG (eds), *Basic & clinical endocrinology*, 7th ed. McGraw-Hill Companies; 2004: 362-413.
- [15] Ashton N. Perinatal development and adult blood pressure. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 731-740.
- [16] Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, Cartwright JE. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 102-108.
- [17] Atherton JC, Dark JM, Garland HO, Morgan MR, Pidgeon J, Soni S. Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J Physiol* 1982; 330: 81-93.
- [18] Azhar S, Reaven E. Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 195: 1-26.

- [19] Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95: 115-128.
- [20] Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease. *Thrombogenesis* 2000; 53: 555-574.
- [21] Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004; 58: 114-115.
- [22] Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989; 298: 564-567.
- [23] Barron WM. Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *Am J Kidney Dis* 1987; 9: 296-302.
- [24] Bassett MH, White PC, Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 67-74.
- [25] Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, Brochu M. Intrauterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 2005; 565: 197-205.
- [26] Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E124-E131.
- [27] Bauer MK, Harding JE, Bassett NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH, Evans PC, Woodall SM, Gluckman PD. Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 115-120.
- [28] Ben-Zimra M, Koler M, Melamed-Book N, Arensburg J, Payne AH, Orly J. Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 223-231.
- [29] Benirschke K. Comparative placentation. In: 2007.
- [30] Bernstein I, Gabbe SG, Reed KL. Intrauterine growth restriction. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL (eds.), *Obstetrics. Normal and problems pregnancies*, 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Inc; 2002: 869-891.
- [31] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- [32] Blank MS, Dufau ML. Rat chorionic gonadotropin: augmentation of bioactivity in the absence of the pituitary. *Endocrinology* 1983; 112: 2200-2202.
- [33] Block BS, Schlafer DH, Wentworth RA, Kreitzer LA, Nathanielsz PW. Regional blood flow distribution in fetal sheep with intrauterine growth retardation produced by decreased umbilical placental perfusion. *J Dev Physiol* 1990; 13: 81-85.
- [34] Bobrovskaya L, Gilligan C, Bolster EK, Flaherty JJ, Dickson PW, Dunkley PR. Sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40: a novel mechanism for maintenance of catecholamine synthesis. *J Neurochem* 2007; 100: 479-489.
- [35] Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ Res* 2007; 100: 520-526.
- [36] Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. *Endocrinology* 1992; 131: 3126-3128.
- [37] Boudouresque F, Guillaume V, Grino M, Strbak V, Chautard T, Conte-Devolx B, Oliver C. Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 417-422.
- [38] Breault L, Lehoux JG, Gallo-Payet N. Angiotensin II receptors in the human adrenal gland. *Endocr Res* 1996; 22: 355-361.

- [39] Brena RM, Huang TH, Plass C. Quantitative assessment of DNA methylation: potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. *J Mol Med* 2006; 1-13.
- [40] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.
- [41] Buikema H. Essential hypertension and left ventricular hypertrophy in cardiovascular disease: beyond overactivity of the renin-angiotensin-aldosterone-sodium system. *J Hypertens* 2003; 21: 265-267.
- [42] Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 2007; 97: 1036-1046.
- [43] Bustamante SA, Pang Y, Romero S, Pierce MR, Voelker CA, Thompson JH, Sandoval M, Liu X, Miller MJ. Inducible nitric oxide synthase and the regulation of central vessel caliber in the fetal rat. *Circulation* 1996; 94: 1948-1953.
- [44] Buttery LD, McCarthy A, Springall DR, Sullivan MH, Elder MG, Michel T, Polak JM. Endothelial nitric oxide synthase in the human placenta: regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface. *Placenta* 1994; 15: 257-265.
- [45] Caluwaerts S, Vercruyse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* 2005; 26: 574-584.
- [46] Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261-271.
- [47] Carneliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-439.
- [48] Carr FE, Chin WW. Absence of detectable chorionic gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids in the rat placenta throughout gestation. *Endocrinology* 1985; 116: 1151-1157.
- [49] Casanueva E, Viteri FE. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr* 2003; 133: 1700S-1708S.
- [50] Challier JC, Uzan S. [The human placenta and its pathologies: focus on oxygen]. *Med Sci (Paris)* 2003; 19: 1111-1120.
- [51] Chamoux E, Breault L, Lehoux JG, Gallo-Payet N. Involvement of the angiotensin II type 2 receptor in apoptosis during human fetal adrenal gland development. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4722-4730.
- [52] Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004; 25: 103-113.
- [53] Chatelain A, Dupouy JP, Allaume P. Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationships in the rat: effects of maternal adrenalectomy. *Endocrinology* 1980; 106: 1297-1303.
- [54] Chatelain A, Durand P, Naaman E, Dupouy JP. Ontogeny of ACTH(1-24) receptors in rat adrenal glands during the perinatal period. *J Endocrinol* 1989; 123: 421-428.
- [55] Cherradi N, Brandenburger Y, Capponi AM. Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 249-256.
- [56] Choi WS, Cho GJ, Won CK, Koh PO. Expression of placenta growth factor mRNA in the rat placenta during mid-late pregnancy. *J Vet Sci* 2005; 6: 179-183.

- [57] Cipolla M, Osol G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 805-811.
- [58] Clapp JF, III, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol* 1997; 80: 1469-1473.
- [59] Clark BJ, Combs R. Angiotensin II and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induce human steroidogenic acute regulatory protein transcription through a common steroidogenic factor-1 element. *Endocrinology* 1999; 140: 4390-4398.
- [60] Clark BJ, Pezzi V, Stocco DM, Rainey WE. The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 115: 215-219.
- [61] Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Imprinted genes in the placenta—a review. *Placenta* 2005; 26 Suppl A: S10-S20.
- [62] Coll AP, Challis BG, Yeo GS, Snell K, Piper SJ, Halsall D, Thresher RR, O'Rahilly S. The effects of proopiomelanocortin deficiency on murine adrenal development and responsiveness to adrenocorticotropic. *Endocrinology* 2004; 145: 4721-4727.
- [63] Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 2005; 186: 1-20.
- [64] Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 1993; 7: 566-571.
- [65] Conrad KP, Vill M, McGuire PG, Dail WG, Davis AK. Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi. *FASEB J* 1993; 7: 1269-1276.
- [66] Cox ME, Parsons SJ. Roles for protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in nicotine-induced secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 1997; 69: 1119-1130.
- [67] Cramer M, Nagy I, Murphy BJ, Gassmann M, Hottiger MO, Georgiev O, Schaffner W. NF-kappaB contributes to transcription of placenta growth factor and interacts with metal responsive transcription factor-1 in hypoxic human cells. *Biol Chem* 2005; 386: 865-872.
- [68] Cronier L, Bastide B, Herve JC, Deleze J, Malassine A. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1994; 135: 402-408.
- [69] Crowe C, Dandekar P, Fox M, Dhingra K, Bennet L, Hanson MA. The effects of anaemia on heart, placenta and body weight, and blood pressure in fetal and neonatal rats. *J Physiol* 1995; 488 (Pt 2): 515-519.
- [70] Czirjak G, Fischer T, Spat A, Lesage F, Enyedi P. TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 863-874.
- [71] Dai SY, Kanenishi K, Ueno M, Sakamoto H, Hata T. Hypoxia-inducible factor-2alpha is involved in enhanced apoptosis in the placenta from pregnancies with fetal growth restriction. *Pathol Int* 2004; 54: 843-849.
- [72] Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavara E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 55-99.
- [73] Davies MJ, Norman RJ. Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 386-392.
- [74] de Gasparo M. [AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features]. *Drugs* 2002; 62 Spec No 1: 1-10.

- [75] de Rijk EP, van EE, Flik G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 271-282.
- [76] Dean W, Lucifero D, Santos F. DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; 75: 98-111.
- [77] Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 2006; 27: 535-539.
- [78] Descamps P, Marret H, Binelli C, Chaplot S, Gillard P. [Body changes during pregnancy]. *Neurochirurgie* 2000; 46: 68-75.
- [79] Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100: 481-492.
- [80] Dodic M, Moritz K, Koukoulas I, Wintour EM. Programmed hypertension: kidney, brain or both? *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 403-408.
- [81] Don BR, Schambelan M, Lo JC. Endocrine hypertension. In: Greenspan FS, Gardner DG (eds.), *Basic & clinical endocrinology*, 7th ed. McGraw-Hill companies; 2004: 414-438.
- [82] Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995; 203: 80-92.
- [83] Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Menheere PP, Schouten HJ, Peeters LL. Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 361-367.
- [84] Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet* 1993; 341: 355-357.
- [85] Ennen WB, Levay-Young BK, Engeland WC. Zone-specific cell proliferation during adrenocortical regeneration after enucleation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E883-E891.
- [86] Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13 Suppl A: S34-S37.
- [87] Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F181-F192.
- [88] Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21-33.
- [89] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.
- [90] Fitzgerald PA, Goldfin A. Adrenal medulla. In: Greenspan FS, Gardner DG (eds.), *Basic & clinical endocrinology*, 7th ed. McGraw-Hill companies; 2004: 439-477.
- [91] Folligan K, Bouvier R, Targe F, Morel Y, Trouillas J. [Development of the human adrenal glands]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2005; 66: 325-332.
- [92] Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.

- [93] Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev* 2005; 81: 723-734.
- [94] Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 29-37.
- [95] Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Seüen F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10604-10609.
- [96] Fu Q, McKnight RA, Yu X, Wang L, Callaway CW, Lane RH. Uteroplacental insufficiency induces site-specific changes in histone H3 covalent modifications and affects DNA-histone H3 positioning in day 0 IUGR rat liver. *Physiol Genomics* 2004; 20: 108-116.
- [97] Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 490-495.
- [98] Funder JW. Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 263-269.
- [99] Funder JW. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 2005; 26: 313-321.
- [100] Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 1988; 242: 583-585.
- [101] Gagnon R. Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110 Suppl 1: S99-107.
- [102] Gallo-Payet N, Guillon G. Regulation of adrenocortical function by vasopressin. *Horm Metab Res* 1998; 30: 360-367.
- [103] Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, Garcia-Sancho J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 2006; 86: 1093-1131.
- [104] Garcia JC, Blanco L, McPherson M, Leiva A, Macias R. High-performance liquid chromatographic determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine in human foetal adrenal gland. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 656: 77-80.
- [105] Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR, Milne CM. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J Endocrinol* 1987; 113: 435-444.
- [106] Garvey EP, Tuttle JV, Covington K, Merrill BM, Wood ER, Baylis SA, Charles IG. Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta. *Arch Biochem Biophys* 1994; 311: 235-241.
- [107] Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002; 23: 3-19.
- [108] Ghidini A. Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. *Obstet Gynecol Surv* 1996; 51: 376-382.
- [109] Ghosh P, Bitsanis D, Ghebremeskel K, Crawford MA, Poston L. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *J Physiol* 2001; 533: 815-822.
- [110] Girard C, Lesage F. [Neuronal background two-P-domain potassium channels: molecular and functional aspects]. *Med Sci (Paris)* 2004; 20: 544-549.

- [111] Gordon MC. Maternal physiology in pregnancy. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL (eds), *Obstetrics: normal and problem pregnancies*, 4th ed. Churchill Livingstone; 2002: 63-91.
- [112] Goto M, Piper HK, Marcos J, Wood PJ, Wright S, Postle AD, Cameron IT, Mason JI, Wilson DI, Hanley NA. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J Clin Invest* 2006; 116: 953-960.
- [113] Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. Births: preliminary data for 2005. *Natl Vital Stat Rep* 2006; 55: 1-18.
- [114] Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13: 343-356.
- [115] Harris LK, Keogh RJ, Wareing M, Baker PN, Cartwright JE, Aplin JD, Whitley GS. Invasive trophoblasts stimulate vascular smooth muscle cell apoptosis by a fas ligand-dependent mechanism. *Am J Pathol* 2006; 169: 1863-1874.
- [116] Hart DL. Genetic Management of Outbred Laboratory Rodent Populations. In: *Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts*; 2001.
- [117] Hayashi TT, Dorko ME. A rat model for the study of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 1203-1207.
- [118] Hempstock J, Bao YP, Bar-Issac M, Segaren N, Watson AL, Charnock-Jones DS, Jauniaux E, Burton GJ. Intralobular differences in antioxidant enzyme expression and activity reflect the pattern of maternal arterial bloodflow within the human placenta. *Placenta* 2003; 24: 517-523.
- [119] Hewitt DP, Mark PJ, Waddell BJ. Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology* 2006; 147: 5568-5574.
- [120] Hoang VM, Foulk R, Clauser K, Burlingame A, Gibson BW, Fisher SJ. Functional proteomics: examining the effects of hypoxia on the cytotrophoblast protein repertoire. *Biochemistry* 2001; 40: 4077-4086.
- [121] Hodel A. Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 2001; 13: 216-220.
- [122] Holt RL. Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 392-397.
- [123] Huber K, Combs S, Emsberger U, Kalchauer C, Unsicker K. Generation of neuroendocrine chromaffin cells from sympathoadrenal progenitors: beyond the glucocorticoid hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 971: 554-559.
- [124] Hunter S, Robson SC. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *Br Heart J* 1992; 68: 540-543.
- [125] Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 29-39.
- [126] Illsley NP. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 2000; 21: 14-22.
- [127] Ishioka S, Ezaka Y, Umemura K, Hayashi T, Endo T, Saito T. Proteomic analysis of mechanisms of hypoxia-induced apoptosis in trophoblastic cells. *Int J Med Sci* 2007; 4: 36-44.
- [128] Jackson AA, Dunn RL, Marchand MC, Langley-Evans SC. Increased systolic blood pressure in rats induced by a maternal low-protein diet is reversed by dietary supplementation with glycine. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103: 633-639.
- [129] Jacobson L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; 34: 271-92, vii.

- [130] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 245-254.
- [131] Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 747-755.
- [132] Jensen A, Garnier Y, Berger R. Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 84: 155-172.
- [133] Jezova D. Control of ACTH secretion by excitatory amino acids: functional significance and clinical implications. *Endocrine* 2005; 28: 287-294.
- [134] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 139-163.
- [135] Johnson MH, Everitt BJ. L'implantation et la formation du placenta. In: De Boeck Université (ed.), *Reproduction*, 5th ed. Paris: Blackwell Science Limited; 2002: 171-190.
- [136] Jones CT, Gu W, Harding JE, Price DA, Parer JT. Studies on the growth of the fetal sheep. Effects of surgical reduction in placental size, or experimental manipulation of uterine blood flow on plasma sulphation promoting activity and on the concentration of insulin-like growth factors I and II. *J Dev Physiol* 1988; 10: 179-189.
- [137] Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-1070.
- [138] JOSIMOVICH JB, LADMAN AJ, DEANE HW. A histophysiological study of the developing adrenal cortex of the rat during fetal and early postnatal stages. *Endocrinology* 1954; 54: 627-639.
- [139] Junien C, Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS. [Nutritional epigenomics of metabolic syndrome]. *Med Sci (Paris)* 2005; 21: 396-404.
- [140] Kalcheim C, Langley K, Unsicker K. From the neural crest to chromaffin cells: introduction to a session on chromaffin cell development. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 971: 544-546.
- [141] Kalhan S, Parimi P. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* 2000; 24: 94-106.
- [142] Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 150-157.
- [143] Kaplan NM. The adrenal glands. In: Griffin JE, Ojeda SR (eds), *Textbook of endocrine physiology*, 4th ed. New York: Oxford University Press Inc.; 2000: 328-356.
- [144] Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; 69: 1-7.
- [145] Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004; 25: 114-126.
- [146] Ke X, Lei Q, James SJ, Kelleher SL, Melnyk S, Jemigan S, Yu X, Wang L, Calloway CW, Chan GM, Albertine KH, McKnight RA, Lane RH. Uteroplacental Insufficiency Affects Epigenetic Determinants of Chromatin Structure in the Brains of Neonatal and Juvenile IUGR Rats. *Physiol Genomics* 2005.
- [147] Keating DJ, Chen C. Activin A stimulates catecholamine secretion from rat adrenal chromaffin cells: a new physiological mechanism. *J Endocrinol* 2005; 186: R1-R5.
- [148] Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 200-208.

- [149] Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10705-10709.
- [150] Kennedy B, Ziegler MG. Ontogeny of epinephrine metabolic pathways in the rat: role of glucocorticoids. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18: 53-59.
- [151] Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 1997; 18: 613-621.
- [152] Kraemer FB, Shen WJ, Harada K, Patel S, Osuga J, Ishibashi S, Azhar S. Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesterol ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 549-557.
- [153] Kraemer FB, Shen WJ, Patel S, Osuga J, Ishibashi S, Azhar S. The LDL receptor is not necessary for acute adrenal steroidogenesis in mouse adrenocortical cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006.
- [154] Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 743-746.
- [155] Krug AW, Vleugels K, Schinner S, Lamounier-Zepter V, Ziegler CG, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II - sensitization in human adrenocortical cells. *Int J Obes (Lond)* 2007.
- [156] Kukor Z, Toth M. Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent NO-synthesizing activities of human primordial placenta. *Acta Physiol Hung* 1994; 82: 313-319.
- [157] Lacoste N, Cote J. [The epigenetic code of histones]. *Med Sci (Paris)* 2003; 19: 955-959.
- [158] Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 1994; 86: 217-222.
- [159] Lash GE, Taylor CM, Trev AJ, Cooper S, Anthony FW, Wheeler T, Baker PN. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions. *Growth Factors* 2002; 20: 189-196.
- [160] Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144: 2179-2183.
- [161] Lenglet S, Louiset E, Delarue C, Vaudry H, Contesse V. Activation of 5-HT(7) receptor in rat glomerulosa cells is associated with an increase in adenylyl cyclase activity and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology* 2002; 143: 1748-1760.
- [162] Lerrant Y, Corbani M, Counis R, Jutisz M. Rat placental mRNA directs the synthesis of a polypeptide immunologically related to alpha-subunit of glycoprotein hormones. *Mol Cell Endocrinol* 1987; 54: 23-28.
- [163] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-365.
- [164] Licht P, Russu V, Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med* 2001; 19: 37-47.
- [165] Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005; 135: 1382-1386.
- [166] Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; 156: 38-50.

- [167] Lyall F. Development of the utero-placental circulation: the role of carbon monoxide and nitric oxide in trophoblast invasion and spiral artery transformation. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 402-411.
- [168] Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E, Robson SC. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. *Am J Pathol* 1999; 154: 1105-1114.
- [169] MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 2004; 5: 674-678.
- [170] MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, Piroozii A, Jernigan S, Hsu JL, Janke SM, Pham TD, Lane RH. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics* 2004; 18: 43-50.
- [171] Malassine A, Frenzo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 531-539.
- [172] Marcal JM, Chew NJ, Salomon DS, Shenman MI. Delta5,3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in rat trophoblast and ovary during pregnancy. *Endocrinology* 1975; 96: 1270-1279.
- [173] Marieb EN. Grossesse et développement prénatal. In: Adisson Wesley Longman Inc. (ed), *Anatomie et physiologie humaines*, 2nd ed. Saint-Laurent: Les éditions du renouveau pédagogique Inc.; 1999: 1086-1115.
- [174] Martin D, Conrad KP. Expression of endothelial nitric oxide synthase by extravillous trophoblast cells in the human placenta. *Placenta* 2000; 21: 23-31.
- [175] Maston GA, Ruvolo M. Chorionic gonadotropin has a recent origin within primates and an evolutionary history of selection. *Mol Biol Evol* 2002; 19: 320-335.
- [176] Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez dC, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
- [177] Matt DW, Macdonald GJ. Placental steroid production by the basal and labyrinth zones during the latter third of gestation in the rat. *Biol Reprod* 1985; 32: 969-977.
- [178] Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 373-380.
- [179] Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 127-139.
- [180] McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, Pearce D. SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 134-139.
- [181] McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; 85: 571-633.
- [182] Mendelson CR. Mechanisms of hormone action. In: James E.Griffin, Sergio R.Ojeda (eds.), *Textbook of endocrine physiology*, Fourth edition ed. New York: Oxford University Press, Inc.; 2000: 51-88.
- [183] Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 1997; 18: 378-403.
- [184] Miller WL. StAR Search - What We Know About How the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Mediates Mitochondrial Cholesterol Import. *Mol Endocrinol* 2006.
- [185] Miozzo M, Simoni G. The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol Neonate* 2002; 81: 217-228.

- [186] Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology* 1999; 140: 3342-3353.
- [187] Mitani F, Mukai K, Ogawa T, Miyamoto H, Ishimura Y. Expression of cytochromes P450 α and P450 β in rat adrenal gland during late gestational and neonatal stages. *Steroids* 1997; 62: 57-61.
- [188] Mitani F, Suzuki H, Hata J, Ogishima T, Shimada H, Ishimura Y. A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology* 1994; 135: 431-438.
- [189] Molenaar WM, Lee VM, Trojanowski JQ. Early fetal acquisition of the chromaffin and neuronal immunophenotype by human adrenal medullary cells. An immunohistological study using monoclonal antibodies to chromogranin A, synaptophysin, tyrosine hydroxylase, and neuronal cytoskeletal proteins. *Exp Neurol* 1990; 108: 1-9.
- [190] Moll SJ, Jones CJ, Crocker IP, Baker PN, Heazell AE. Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. *Apoptosis* 2007.
- [191] Morley SD, Viard I, Chung BC, Ikeda Y, Parker KL, Mullins JJ. Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/ β -galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 585-598.
- [192] Myatt L, Brockman DE, Eis AL, Pollock JS. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta* 1993; 14: 487-495.
- [193] Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 369-382.
- [194] Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod* 1997; 12: 167-172.
- [195] Nanaev A, Chwalisz K, Frank HG, Kohnen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P. Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res* 1995; 282: 407-421.
- [196] Nawata H, Ohashi M, Haji M, Takayanagi R, Higuchi K, Fujio N, Hashiguchi T, Ogo A, Nakao R, Ohnaka K, . Atrial and brain natriuretic peptide in adrenal steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40: 367-379.
- [197] Ni Y, May V, Braas K, Osol G. Pregnancy augments uteroplacental vascular endothelial growth factor gene expression and vasodilator effects. *Am J Physiol* 1997; 273: H938-H944.
- [198] Nussdorfer GG, Bahcelioglu M, Neri G, Malendowicz LK. Secretin, glucagon, gastric inhibitory polypeptide, parathyroid hormone, and related peptides in the regulation of the hypothalamus- pituitary-adrenal axis. *Peptides* 2000; 21: 309-324.
- [199] Ozanne SE, Hales CN. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 368-373.
- [200] Pankratz DS. The development of the suprarenal gland in the albino rat with a consideration of its possible relation to the origin of foetal movements. *Anat Rec* 1931; 49: 31-49.
- [201] Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 402-409.
- [202] Pasqualini JR. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 401-415.

- [203] Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004; 25: 947-970.
- [204] Peleg D, Kennedy CM, Hunter SK. Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am Fam Physician* 1998; 58: 453-457.
- [205] Pepe GJ, Albrecht ED. Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* 1995; 16: 608-648.
- [206] Perazella MA, Setaro JF. Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nucl Cardiol* 2003; 10: 184-196.
- [207] Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol* 2003; 552: 667-671.
- [208] Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, Lane RH. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R962-R970.
- [209] Phillips DI. Twin studies in medical research: can they tell us whether diseases are genetically determined? *Lancet* 1993; 341: 1008-1009.
- [210] Pijnenborg R, Aplin JD, Ain R, Bevilacqua E, Bulmer JN, Cartwright J, Huppertz B, Knofler M, Maxwell C, Vercruyse L. Trophoblast and the endometrium--a workshop report. *Placenta* 2004; 25 Suppl A: S42-S44.
- [211] Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27: 939-958.
- [212] Porter JD, Whitehouse BJ, Price GM, Hinson JP, Vinson GP. Effects of dopamine, high potassium concentration and field stimulation on the secretion of aldosterone by the perfused rat adrenal gland. *J Endocrinol* 1992; 133: 275-282.
- [213] Poston L. The control of blood flow to the placenta. *Exp Physiol* 1997; 82: 377-387.
- [214] Purcell TL, Buhimschi IA, Given R, Chwalisz K, Garfield RE. Inducible nitric oxide synthase is present in the rat placenta at the fetal-maternal interface and decreases prior to labour. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 485-491.
- [215] Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005; 21: 775-777.
- [216] Ray-Gallet D, Gerard A, Polo S, Almouzni G. [Variations on the topic of the "histone code"]. *Med Sci (Paris)* 2005; 21: 384-389.
- [217] Rebuffat P, Mazzocchi G, Macchi C, Malendowicz LK, Gottardo G, Nussdorfer GG. Mechanisms and receptor subtypes involved in the stimulatory action of endothelin-1 on rat adrenal zona glomerulosa. *Int J Mol Med* 1999; 3: 307-310.
- [218] Reik W, Constancia M, Fowden A, Anderson N, Dean W, Ferguson-Smith A, Tycko B, Sibley C. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J Physiol* 2003; 547: 35-44.
- [219] Reik W, Dean W. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* 2001; 22: 2838-2843.
- [220] Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21-32.
- [221] Reinisch JM, Simon NG, Karow WG, Gandelman R. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* 1978; 202: 436-438.
- [222] Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 490-496.

- [223] Reusens B, Remacle C. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 913-922.
- [224] Ribeiro ML, Fatina M, Billi S, Perez MS, Branes MC, Villalon M, Franchi A. Effect of in vivo administration of epidermal growth factor on prostaglandin production and NOS activity in term rat placentae. Possible participation of placental EGF receptors. *Placenta* 2005; 26: 758-765.
- [225] Rosenfeld CR. Mechanisms regulating angiotensin II responsiveness by the uteroplacental circulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R1025-R1040.
- [226] Rosso P, Donoso E, Braun S, Espinoza R, Fernandez C, Salas SP. Maternal hemodynamic adjustments in idiopathic fetal growth retardation. *Gynecol Obstet Invest* 1993; 35: 162-165.
- [227] Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006; 580: 2879-2887.
- [228] Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 608-613.
- [229] Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdes G, Donoso E. Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 1029-1033.
- [230] Sanyal M, Nag TC, Das C. Localization of nitric oxide synthase in human trophoblast cells: role of nitric oxide in trophoblast proliferation and differentiation. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43: 70-77.
- [231] Scheepers A, Joost HG, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28: 364-371.
- [232] Schiessl B, Mylonas I, Kuhn C, Kunze S, Schulze S, Friese K, Jeschke U. Expression of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta and placental endothelial and inducible NO synthase in intrauterine growth-restricted and normal placentals. *Arch Med Res* 2006; 37: 967-975.
- [233] Schöni-Affolter F, Dubuis-Grieder C, Strauch E. Embryologie humaine. In. 2006.
- [234] Schröder HJ. Models of fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110 Suppl 1: S29-S39.
- [235] Seasholtz A. Regulation of adrenocorticotrophic hormone secretion: lessons from mice deficient in corticotropin-releasing hormone. *J Clin Invest* 2000; 105: 1187-1188.
- [236] Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004; 151 Suppl 3: U49-U62.
- [237] Seidl K, Unsicker K. The determination of the adrenal medullary cell fate during embryogenesis. *Dev Biol* 1989; 136: 481-490.
- [238] Sewer MB, Waterman MR. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 300-307.
- [239] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66.
- [240] Shanmugam S, Corvol P, Gasc JM. Ontogeny of the two angiotensin II type 1 receptor subtypes in rats. *Am J Physiol* 1994; 267: E828-E836.
- [241] Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E, Corvol P, Gasc JM. Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol* 1995; 268: F922-F930.

- [242] Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1993; 132: 1387-1395.
- [243] Shin BC, Fujikura K, Suzuki T, Tanaka S, Takata K. Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: a possible machinery for the transplacental transfer of glucose. *Endocrinology* 1997; 138: 3997-4004.
- [244] Shin BC, Suzuki T, Matsuzaki T, Tanaka S, Kuraoka A, Shibata Y, Takata K. Immunolocalization of GLUT1 and connexin 26 in the rat placenta. *Cell Tissue Res* 1996; 285: 83-89.
- [245] Sibley CP, Glazier JD, Greenwood SL, Lacey H, Mynett K, Speake P, Jansson T, Johansson M, Powell TL. Regulation of placental transfer: the Na(+)/H(+) exchanger--a review. *Placenta* 2002; 23 Suppl A: S39-S46.
- [246] Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 57-65.
- [247] Soares MJ. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 51.
- [248] Soccio RE, Breslow JL. StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J Biol Chem* 2003; 278: 22183-22186.
- [249] Spat A. Glomerulosa cell--a unique sensor of extracellular K⁺ concentration. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 23-26.
- [250] Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1110-1115.
- [251] St-Louis J, Pare H, Sicotte B, Brochu M. Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am J Physiol* 1997; 273: H1148-H1153.
- [252] St-Louis J, Sicotte B, Beausejour A, Brochu M. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 2006; 131: 331-339.
- [253] Stocco DM. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486: 184-197.
- [254] Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 193-213.
- [255] Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev* 2005; 26: 877-897.
- [256] Sucheston ME, Cannon MS. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J Morphol* 1968; 126: 477-491.
- [257] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 227-241.
- [258] Takata K, Hirano H. Mechanism of glucose transport across the human and rat placental barrier: a review. *Microsc Res Tech* 1997; 38: 145-152.
- [259] Takizawa T, Yoshikawa H, Yamada M, Morita H. Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C762-C767.
- [260] Taylor RN, Lebovic DI. The endocrinology of pregnancy. In: Greenspan FS, Gardner DG (eds.), *Basic & clinical endocrinology*, 7th ed. McGraw-Hill companies; 2004: 637-657.
- [261] Tepper MA, Roberts JL. Evidence for only one beta-luteinizing hormone and no beta-chorionic gonadotropin gene in the rat. *Endocrinology* 1984; 115: 385-391.

- [262] Torgersen KL, Curran CA. A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q* 2006; 29: 2-19.
- [263] Tortora GJ, Grabowski SR. Le développement prénatal, la naissance et l'hérédité. In: John Wiley & Sons Inc (ed.), *Principes d'anatomie et de physiologie*, 9th ed. Saint-Laurent: Les éditions du renouveau pédagogique Inc; 2001: 1087-1121.
- [264] Tremblay Y, Provost PR. 17Beta-HSD type 5 expression and the emergence of differentiated epithelial Type II cells in fetal lung: a novel role for androgen during the surge of surfactant. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248: 118-125.
- [265] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344.
- [266] Vallon V, Wulff P, Huang DY, Loffing J, Volkl H, Kuhl D, Lang F. Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R4-10.
- [267] Vandenbosche RC, Kirchner JT. Intrauterine growth retardation. *Am Fam Physician* 1998; 58: 1384.
- [268] Vatish M, Randeve HS, Grammatopoulos DK. Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia. *Trends Mol Med* 2006; 12: 223-233.
- [269] Vercruyse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 2006; 27: 22-33.
- [270] Verhofstad AA, Hokfelt T, Goldstein M, Steinbusch HW, Joosten HW. Appearance of tyrosine hydroxylase, aromatic amino-acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase during the ontogenesis of the adrenal medulla: an immunohistochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* 1979; 200: 1-13.
- [271] Verschoor-Klootwyk AH, Verschoor L, Azhar S, Reaven GM. Role of exogenous cholesterol in regulation of adrenal steroidogenesis in the rat. *J Biol Chem* 1982; 257: 7666-7671.
- [272] Volpi S, Rabadan-Diehl C, Aguilera G. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. *Stress* 2004; 7: 75-83.
- [273] Wigglesworth JS. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. *Am J Pathol* 1974; 77: 347-350.
- [274] Wilburn LA, Jaffe RB. Quantitative assessment of the ontogeny of met-enkephalin, norepinephrine and epinephrine in the human fetal adrenal medulla. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118: 453-459.
- [275] Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, de IL-M, Rothblat GH. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 329-339.
- [276] Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 1966; 89: 300-306.
- [277] Wolkersdorfer GW, Bornstein SR. Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 163-171.
- [278] Woodall SM, Breier BH, Johnston BM, Gluckman PD. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. *J Endocrinol* 1996; 150: 231-242.
- [279] Wotus C, Levay-Young BK, Rogers LM, Gomez-Sanchez CE, Engeland WC. Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* 1998; 139: 4397-4403.
- [280] Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66: 802-812.

- [281] Xia Y, Wikberg JE. Localization of ACTH receptor mRNA by in situ hybridization in mouse adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1996; 286: 63-68.
- [282] Yamamoto M, Yanai R, Arishima K. Study of migration of neural crest cells to adrenal medulla by three-dimensional reconstruction. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 635-641.
- [283] Yohan. Voie de biosynthèse des catécholamines. In. Wikipédia; 2004.
- [284] Young JB. Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 381-385.
- [285] Young LE. Imprinting of genes and the Barker hypothesis. *Twin Res* 2001; 4: 307-317.
- [286] Zajicek G, Ariel I, Arber N. The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. *J Endocrinol* 1986; 111: 477-482.
- [287] Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension* 2006; 47: 502-508.
- [288] Zhou H, Aziza J, Sol JC, Courtade-Saïdi M, Chatelin S, Evra C, Parant O, Lazorthes Y, Jozan S. Cell therapy of pain: Characterization of human fetal chromaffin cells at early adrenal medulla development. *Exp Neurol* 2006; 198: 370-381.
- [289] Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 2005; 70: 407-417.
- [290] Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110 Suppl 1: S10-S18.

- [262] Torgersen KL, Curran CA. A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Crit Care Nurs Q* 2006; 29: 2-19.
- [263] Tortora G], Grabowski SR. Le développement prénatal, la naissance et l'hérédité. In: John Wiley & Sons Inc (ed.), *Principes d'anatomie et de physiologie*, 9th ed. Saint-Laurent: Les éditions du nouveau pédagogique Inc; 2001: 1087-1121.
- [264] Tremblay Y, Provost PR. 17Beta-HSD type 5 expression and the emergence of differentiated epithelial Type II cells in fetal lung: a novel role for androgen during the surge of surfactant. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248: 118-125.
- [265] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344.
- [266] Vallon V, Wulff P, Huang DY, Loffing J, Voldk H, Kuhl D, Lang F. Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R4-10.
- [267] Vandenbosche RC, Kirchner JT. Intrauterine growth retardation. *Am Fam Physician* 1998; 58: 1384.
- [268] Vatish M, Randeve HS, Grammatopoulos DK. Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia. *Trends Mol Med* 2006; 12: 223-233.
- [269] Vercruyse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 2006; 27: 22-33.
- [270] Verhofstad AA, Hokfelt T, Goldstein M, Steinbusch HW, Joosten HW. Appearance of tyrosine hydroxylase, aromatic amino-acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase during the ontogenesis of the adrenal medulla: an immunohistochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* 1979; 200: 1-13.
- [271] Verschoor-Klootwyk AH, Verschoor L, Azhar S, Reaven GM. Role of exogenous cholesterol in regulation of adrenal steroidogenesis in the rat. *J Biol Chem* 1982; 257: 7666-7671.
- [272] Volpi S, Rabadan-Diehl C, Aguilera G. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. *Stress* 2004; 7: 75-83.
- [273] Wigglesworth JS. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. *Am J Pathol* 1974; 77: 347-350.
- [274] Wilburn LA, Jaffe RB. Quantitative assessment of the ontogeny of met-enkephalin, norepinephrine and epinephrine in the human fetal adrenal medulla. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118: 453-459.
- [275] Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swamakar S, Phillips MC, de IL-M, Rothblat GH. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 329-339.
- [276] Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 1966; 89: 300-306.
- [277] Wolkersdorfer GW, Bornstein SR. Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 163-171.
- [278] Woodall SM, Breier BH, Johnston BM, Gluckman PD. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. *J Endocrinol* 1996; 150: 231-242.
- [279] Worus C, Levay-Young BK, Rogers LM, Gomez-Sanchez CE, Engeland WC. Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* 1998; 139: 4397-4403.
- [280] Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66: 802-812.